



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Ritmicidad circadiana de la actividad locomotora
en el ajolote *Ambystoma mexicanum*:
sincronización a la luz y al alimento

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

José Manuel Valdez Caro



DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez

2019

Ciudad Universitaria, CDMX



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.

1. Datos del alumno

Valdez

Caro

José Manuel

58 94 10 51

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

309333337

2. Datos del tutor

Dra.

Ruth Cecilia

Vanegas

Pérez

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Manuel

Miranda

Anaya

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Guillermina

Alcaraz

Zubeldia

5. Datos del sinodal 3

M. en C.

Sebastián Ricardo

Zúñiga

Lagunes

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Elsa Guadalupe

Escamilla

Chimal

7. Datos del trabajo escrito

Ritmicidad circadiana de la actividad locomotora

en el ajolote *Ambystoma mexicanum*:

Sincronización a la luz y al alimento

82 p.

2019

DEDICATORIA

A mis padres, Ma. de los Ángeles Caro Sepúlveda y José Valdez Arellano.

Por su paciencia y resignación hasta el final de esta etapa de mi vida.

*“Debemos aceptar la decepción finita,
pero nunca debemos perder la esperanza infinita”*

Martin Luther King

AGRADECIMIENTOS

Aunque para llegar hasta este punto fue menester mi perseverancia y trabajo constante, he de mostrar mi gratitud infinita hacia mi querida Universidad Nacional Autónoma de México y hacia todas aquellas personas sin cuya colaboración este trabajo no hubiera sido posible.

Para empezar agradezco a la Dra. Cecilia Vanegas Pérez por abrirme las puertas del Laboratorio de Ecotoxicología de Organismos Acuáticos. Este espacio de la Facultad de Ciencias fue durante algunos meses como mi segundo hogar y en él pude conocer a un equipo de trabajo sin igual. El M. en C. Sebastián Zúñiga es sin dudas uno de mis grandes maestros en el sentido amplio de la palabra, y le agradezco no solo su apoyo, enseñanzas y supervisión en el ámbito académico, sino su actitud tan paciente y amigable con los estudiantes, quienes tendemos a equivocarnos y no siempre realizamos las cosas bien a la primera. También doy gracias al M. en C. Julio Prieto por ser tan excelente comunicador del conocimiento, pues fue gracias a él que logré comprender lo que conozco de cronobiología, y sus explicaciones avivaron mi motivación para concluir este trabajo experimental. Ambos maestros hicieron aportes invaluable a mi tesis y compartieron mi frustración cuando las cosas no salían bien a la primera, ni a la segunda...

El equipo de trabajo del laboratorio no estaría completo sin mi colega del alma Carolina Patiño, gracias por tu compañía, invaluable amistad y todos los momentos que compartimos en nuestro proceso de titulación. He de mencionar también a Sebastian Vadillo, a quien admiro como científico y amigo. A pesar de no haber sido tu alumno en un salón de clases estoy seguro de que eres un gran maestro, pues tus enseñanzas pude ponerlas en práctica, trabajando con mis propias manos.

Agradezco a Jocelyn Bustamante por la formación que de ella obtuve durante mi servicio social en la Unidad de Análisis Ambiental de la Facultad de Ciencias. En este lugar también conté con el apoyo de mi tocayo el M. en C. Manuel Hernández Quiroz.

Gracias al Ing. Adrián Hernández Alva por la elaboración y programación del Sistema de Registro de Actividad Locomotora, que hizo posible el desarrollo de mis experimentos.

Dentro de mis profesores de la carrera, quiero agradecer de manera especial a la Dra. Laura Vargas Parada, por sembrar en mí la pasión por divulgar el conocimiento y su disposición para apoyarme cuando las condiciones de mi proceso de titulación parecían adversas.

Debo también un agradecimiento al Dr. Manuel Miranda, la Dra. Guillermina Alcaraz y la Dra. Elsa Escamilla, pues su colaboración como sinodales aportó valiosas observaciones que permitieron hacer de la versión final de mi tesis un trabajo digno para mi titulación.

Finalmente agradezco el apoyo e inquebrantable paciencia de mi familia y mis amigos. A mis padres debo el privilegio que tuve de poder enfocarme y entregarme a tiempo completo a mi carrera. Los amo con todo mi ser, y sin temor a equivocarme les digo que estudiar biología es lo mejor que me ha pasado en la vida. Mi hermano Daniel y mi tía Lore son los mejores testigos de ello. Y fueron precisamente mis primos y mis amigas los mejores compañeros en esta maravillosa experiencia. Miguel, Carlos, Mario y Guillermo, no tengo mejores amigos que ustedes. Y Nicole, Itzel, Sally, Alex, Tania, Dulce, Mich; amigas mías, sepan que ocupan un lugar muy especial en mi corazón.

Ritmicidad circadiana de la actividad locomotora en el ajolote *Ambystoma mexicanum*: sincronización a la luz y al alimento.

ÍNDICE

RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Generalidades de cronobiología.....	10
1.1.1. Ritmos circadianos	10
1.1.2. Organización del sistema circadiano.....	11
1.1.3. Actividad locomotora y actogramas	12
1.2. Sincronización.....	13
1.2.1. Fundamentos.....	13
1.2.2. Sincronización al alimento	14
1.2.4. Fenómenos a considerar al evaluar la sincronización	17
1.3. Estudio de los ritmos circadianos en anfibios	18
1.4. Organismo de estudio	19
1.4.1 Biología del ajolote	19
1.4.4. Importancia de <i>Ambystoma mexicanum</i>	20
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVO.....	24
Objetivo general:.....	24
Objetivos particulares:.....	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5.1. Obtención de organismos de estudio	24
5.2. Mantenimiento y alimentación de los organismos	25
5.2.1. Mantenimiento	25
5.2.2. Alimentación	25
5.3. Diseño experimental.....	26
5.3.1. Condiciones experimentales	26
5.3.2. Selección de organismos para las condiciones experimentales.....	27
5.4. Montaje y calibración del sistema de Registro de Actividad Locomotora (RALM) Omniaiva ®.....	27
5.4.1. Descripción del sistema	27
5.4.2. Calibración y pruebas de registro y de alimentación	30
5.4. Registros experimentales	32

5.4.1. Registro en fotoperiodo LO	32
5.4.2. Registro en fotoperiodo OO	33
5.5. Procesamiento informático de los datos de registro	33
5.5.1. Procesamiento de videos por el software OA_Axolote en Matlab	33
5.5.2. Obtención de actogramas a partir de los datos obtenidos en MATLAB.....	33
5.6. Caracterización del ritmo de actividad locomotora.	34
5.7. Análisis estadístico.....	35
6. RESULTADOS	36
6.1 Mediciones morfométricas de los organismos de estudio.....	36
6.2 Parámetros fisicoquímicos	36
6.3 Actogramas.....	37
6.4 Caracterización de ritmos de actividad locomotora y efectos de la intensidad lumínica y el patrón alimentario.....	39
6.5 Efecto de la luz y el patrón de alimentación en los parámetros de los ritmos	46
7. DISCUSIÓN.....	55
7.1 Ritmicidad circadiana de la actividad locomotora de <i>Ambystoma mexicanum</i> . Aspectos generales.	55
7.2 Efecto de la intensidad lumínica y el patrón alimentario en el ritmo de actividad y su sincronización	56
7.3 Aspectos a considerar en estudios futuros	60
8. CONCLUSIONES	61
9. RECOMENDACIONES.....	62
10. LITERATURA CITADA	63
ANEXO I. MÉTODO DE ANÁLISIS DE PERIODOGRAMA.....	72
ANEXO II. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS ESTADÍSTICAS	74
1. Comparaciones múltiples	74
2. Comparaciones pareadas	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características de un ritmo circadiano	11
Figura 2. Organización de un sistema circadiano hipotético de anfibio.....	12
Figura 3. Ejemplo de un actograma con datos doblemente graficados.....	13
Figura 4. Esquema básico del sistema de Registro de Actividad Locomotora (RALM).....	28
Figura 5. Esquema de una de las cámaras del sistema RALM OmniaIva.....	30
Figura 6. Actograma promedio de los ajolotes de cada condición experimental, en luz- oscuridad (LO) y oscuridad continua (OO).....	38
Figura 7. Actividad locomotora de <i>A. mexicanum</i> a lo largo del periodo, en la condición experimental A-S (intensidad lumínica alta y alimentación sincrónica)	41
Figura 8. Actividad locomotora de <i>A. mexicanum</i> a lo largo del periodo, en la condición experimental B-S (intensidad lumínica alta y alimentación sincrónica).....	42
Figura 9. Actividad locomotora de <i>A. mexicanum</i> a lo largo del periodo, en la condición experimental A-As (intensidad lumínica baja y alimentación asincrónica).....	44
Figura 10. Actividad locomotora de <i>A. mexicanum</i> a lo largo del periodo, en la condición experimental B-As (intensidad lumínica alta y alimentación asincrónica).....	45
Figura 11. Diagrama de cajas en paralelo del periodo bajo todas las condiciones experimentales, en OO y LO.....	46
Figura 12. Diagrama de cajas en paralelo de la amplitud bajo todas las condiciones experimentales, en OO y LO.....	47
Figura 13. Diagrama de cajas en paralelo de la actividad promedio bajo todas las condiciones experimentales, en OO y LO.....	48
Figura 14. Diagrama de cajas en paralelo de la acrofase bajo todas las condiciones experimentales, en OO y LO.....	49
Figura 15. Diagrama de cajas en paralelo del inicio de actividad bajo todas las condiciones experimentales, en OO y LO.....	50
Figura 16. Diagrama de cajas en paralelo de horas de actividad (α) bajo todas las condiciones experimentales, en OO y LO.....	51
Figura 17. Diagrama de cajas en paralelo de horas de reposo (ρ) bajo todas las condiciones experimentales, en OO y LO.....	52
Figura 18. Diagrama de cajas en paralelo de la razón α/ρ bajo todas las condiciones experimentales, en OO y LO.....	53
Figura 19. Diagrama de cajas en paralelo de diferencia acrofase-alimento.....	54
Figura 20. Diagrama de cajas en paralelo de diferencia alimento-inicio de actividad.....	54
Figura 21. Periodograma obtenido con ActogramJ mostrando un periodo significativo de 1440 minutos (24 h).....	72
Figura 22. Periodograma obtenido con ActogramJ mostrando un periodo no significativo....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones experimentales y su combinación de variables.....	26
Tabla 2. Relación de pesos y medidas morfométricas de los organismos experimentales al inicio de los registros.....	36
Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos evaluados a lo largo del periodo de registro, de 12 días.....	37
Tabla 4. Parámetros del ritmo de la actividad locomotora en <i>A. mexicanum</i> provenientes de las diferentes condiciones experimentales.....	40

RESUMEN

El estado de conservación del ajolote *Ambystoma mexicanum*, especie en peligro crítico de extinción, hace necesario su mantenimiento en cautiverio mientras no pueda ser reintroducido en el humedal de Xochimilco, que constituye su hábitat silvestre. Aunque diversos grupos de investigación han logrado mantener y reproducir esta especie en cautiverio, se desconocen los efectos que las variables ambientales como la iluminación o el patrón de alimentación pueden tener en la conducta de los ajolotes, particularmente en el ritmo de actividad locomotora. Dada la relevancia adaptativa de este aspecto regulatorio del comportamiento, se diseñó una serie de cuatro experimentos con el objetivo de caracterizar el ritmo circadiano de la actividad locomotora de juveniles de *A. mexicanum* y evaluar la capacidad de las variables intensidad lumínica y patrón de alimentación como estímulos sincronizantes (zeitgebers). Se evaluó el efecto de dos diferentes intensidades de luz, alta A (650 luxes) y baja B (130 luxes), así como dos patrones de alimentación, sincrónico S (suministro de alimento restringido a dos horas, a las 11:00 h) y asincrónico As (suministro restringido a dos horas, a distinta hora cada día). Estas variables se combinaron en cuatro diferentes condiciones experimentales (A-S, A-As, B-S y B-As). Se utilizó un Sistema de Registro de Actividad Locomotora y el análisis de Image-J para el análisis de los resultados y la obtención de los parámetros del ritmo de actividad locomotora de cada organismo que permitieron la caracterización del ritmo en cada condición experimental. Todos los organismos mostraron un ritmo de actividad diurno que denota la capacidad de la luz y el alimento de actuar como sincronizadores fuertes al ocasionar el cambio completo de fase. En las condiciones A-S, A-As y B-S se detectó un periodo significativo cercano a las 24 h en el 100% de los organismos en Luz-Oscuridad (LO) y en cerca del 60 al 70% en Oscuridad Constante (OO); en la condición B-As (menor fuerza de los estímulos evaluados) se pudo caracterizar el ritmo en el 70% de los organismos en LO y en el 25% en OO. El análisis de los resultados obtenidos bajo diferentes intensidades de luz (A-S y A-As contra B-S y B-As) demuestra su capacidad sincronizante efectiva, si bien en intensidad alta se registraron los mayores niveles de actividad. En todas las condiciones fue evidente la elevada variabilidad de los registros al pasar de LO a OO. En el presente estudio se sugiere la ritmicidad circadiana de la actividad locomotora de *A. mexicanum* y se corrobora al estímulo de luz como sincronizador central. Asimismo el alimento se postula como un sincronizador fuerte, capaz de marcar fase y modular la actividad hacia un comportamiento diurno unimodal. Para dilucidar interrogantes generadas en el presente estudio, se sugiere una mayor extensión del periodo de registro en OO en experimentos futuros, así como aplicar otros patrones de alimentación incluyendo alimentación durante las horas de oscuridad, lo que permitirá corroborar si la atenuación y variación observada está relacionada con post-efectos o un reajuste hacia un estado estable anterior.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de cronobiología

1.1.1. Ritmos circadianos

Los seres vivos están sujetos a los cambios periódicos que ocurren en el planeta, donde están sujetos a fluctuaciones ambientales. Algunas de estas fluctuaciones, como las oscilaciones de las mareas, las fases lunares y el cambio estacional se consideran de tipo cíclico, ya que se pueden reconocer sus diferentes fases y el momento en el que se completan y vuelven a iniciar. Hay un ciclo en particular que afecta de forma importante y cotidiana a prácticamente todos los organismos: el ciclo del día y la noche. Dado que las condiciones del ambiente y los requerimientos por parte de los seres vivos no son iguales a lo largo de las veinticuatro horas de un día, es de vital importancia que existan oscilaciones en los procesos funcionales y conductuales de los organismos. La ritmicidad y los procesos oscilatorios representan presiones selectivas ambientales relevantes en la evolución de todos los grupos de organismos y por ende son de gran valor adaptativo (Aguilar-Roblero *et al.*, 2008; Yerushalmi y Green, 2009).

Los ritmos circadianos presentan características que permiten definirlos desde varios enfoques. Un proceso biológico con variaciones periódicas es circadiano cuando se ajusta al ciclo ambiental de luz y oscuridad; es decir, el ciclo de un día. También es circadiano porque su frecuencia es de un ciclo por día, a diferencia de los infradianos, donde un ciclo no se alcanza a completar en un día, y los ultradianos, cuya frecuencia es de varios ciclos por día. Sin embargo, la característica principal que define a los ritmos circadianos es su oscilación espontánea o de libre curso, es decir, el ciclo persiste aun cuando se retira el estímulo ambiental al cual se ajusta. El ejemplo más común es colocar al organismo en condiciones de oscuridad continua, lo que significa anular el estímulo del ciclo luz-oscuridad. Lo anterior evidencia que los ritmos circadianos se rigen de forma endógena donde la estructura responsable de mantener dicho ritmo se define como reloj biológico (Dunlap *et al.*, 2003).

Dado el comportamiento oscilatorio de las respuestas biológicas rítmicas, su análisis y descripción se realiza utilizando la terminología de las ondas físicas. Así, el *ritmo* se define como un cambio que se repite siguiendo un mismo patrón, probabilidad y periodo. El *periodo* es la principal característica que identifica un ritmo biológico, y representa el tiempo requerido para completar un ciclo. El número de ciclos que se completan en una unidad de tiempo está expresado por la *frecuencia*. Otras características de los ritmos son las *fases*. Una fase puede definirse como cualquier estado instantáneo repetible del ciclo; por ejemplo, el momento en que la variable biológica alcanza su punto más alto, lo que se denomina *acrofase* (Koukkari y Sothorn, 2006). El punto más bajo es la *batifase*, y la diferencia entre el punto más alto y el más bajo define la *amplitud* (Aguilar-Roblero *et al.*, 2008). Las fases pueden expresarse en unidades de tiempo tomando como punto de referencia un momento arbitrario del ciclo, por ejemplo el encendido de la luz (Fig. 1).

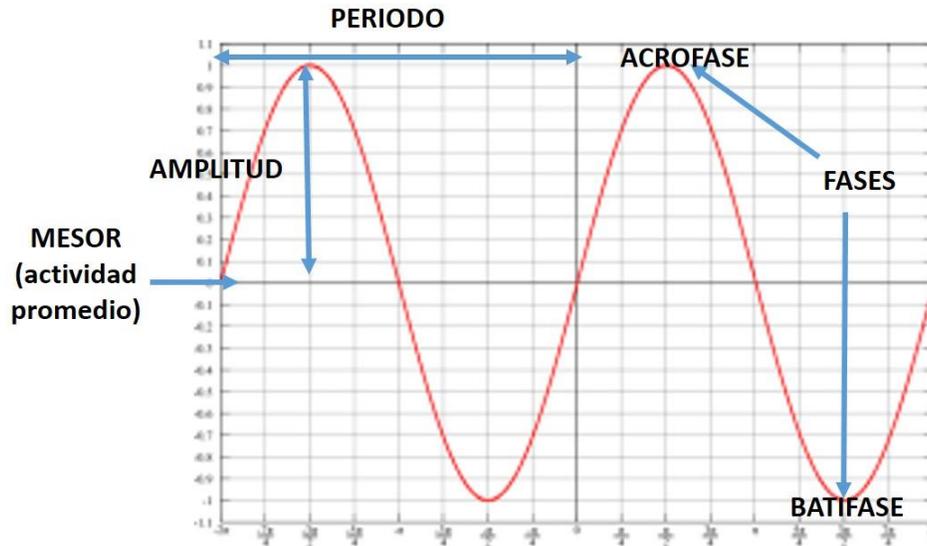


Figura 1. Características de un ritmo circadiano. Se muestra un ritmo graficado en un plano cartesiano con forma sinusoidal. Modificado de Aguilar-Roblero *et al.* (2008).

1.1.2. Organización del sistema circadiano

La organización circadiana se refiere a la manera en que el sistema circadiano se integra en el organismo, así como los principios que determinan las interacciones entre los distintos componentes de este sistema. Aunque en los vertebrados es posible encontrar diversidad en las formas de organización circadiana, se pueden señalar las siguientes generalizaciones: 1) hay un “eje circadiano” encargado de sincronizar e imponer las fases, conformado por las retinas, la glándula pineal y el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo; 2) la glándula pineal funge a la vez como fotorreceptor y como oscilador circadiano en muchos vertebrados no mamíferos y, 3) los vertebrados no mamíferos (incluyendo anfibios) cuentan con fotorreceptores circadianos extrarretinales y extrapineales, ubicados en el encéfalo o en las estructuras más internas del cerebro (Foster *et al.* 1994). Por otro lado, se postula que la diversidad de la organización circadiana en vertebrados radica en que la antigüedad del eje circadiano básico se remonta a los orígenes de este clado, hace más de 500 millones de años, siendo lo suficientemente flexible para modificarse de acuerdo con los diferentes nichos de los distintos grupos (Menaker *et al.* 1997).

El eje circadiano ocupa una posición central en el sistema, donde la estructura que actúa como reloj maestro recibe las señales de los estímulos cíclicos externos, y después marca la fase para otros sistemas y funciones biológicas que manifiestan este orden temporal como las manecillas de un reloj, lo que se denomina como ritmos observables (Fig. 2).

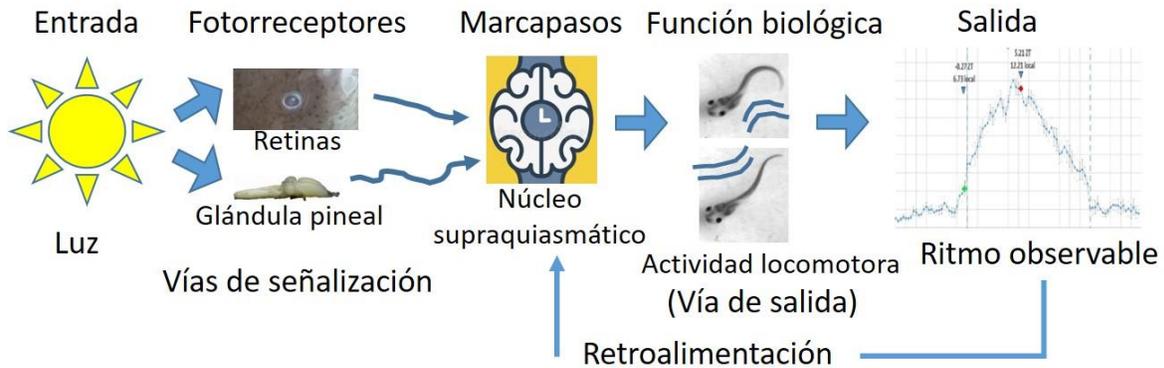


Figura 2. Organización de un sistema circadiano hipotético de anfibio. Modificado de Aguilar-Roblero *et al.* (2009).

1.1.3. Actividad locomotora y actogramas

Desde el inicio de los estudios de los ritmos biológicos, el ciclo de la actividad locomotora como un ritmo observable se ha utilizado para interpretar de manera general los hábitos del organismo estudiado, permitiendo conocer si se ajusta a un patrón diurno o nocturno (Palmer *et al.*, 1976). El estudio de los ritmos a nivel conductual se facilita por su interpretación convencional mediante actogramas, en los que la actividad del organismo puede graficarse de forma continua o por lapsos de manera constante, en pequeños bloques de actividad cuya duración se denomina “bin” (Jud *et al.*, 2005). De este modo, en los actogramas se puede seguir con facilidad la actividad de los organismos, a través de varios días y en cada hora. La incorporación en el actograma de los datos “doblemente graficados” (Fig. 3) es útil para visualizar el patrón de actividad de manera ininterrumpida, sin importar las horas del día en las que esta ocurre. Este método para graficar también es útil cuando se da seguimiento al libre curso de un ritmo (oscuridad constante) durante muchos días sucesivos, pues se evita que el patrón de actividad se vea “interrumpido”, lo que probablemente ocurriría en un actograma sencillo.

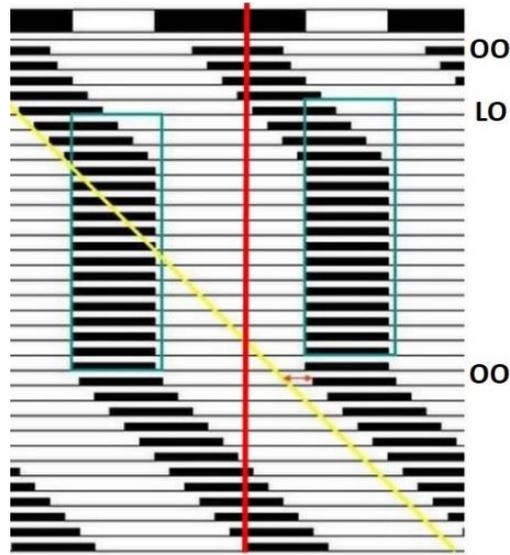


Figura 3. Ejemplo de un actograma con datos doblemente graficados. Cada renglón muestra la actividad de los organismos en dos días consecutivos, y el segundo de estos días vuelve a graficarse (se repite) en el renglón inferior inmediato para el seguimiento vertical de la actividad. Como indica la línea roja, el doble gráfico evita que el patrón de actividad se vea “interrumpido” en OO. LO (Luz:oscuridad); OO (oscuridad constante).

1.2. Sincronización

1.2.1. Fundamentos

Una de las principales características que dan valor adaptativo a los ritmos circadianos es su capacidad de sincronizarse a ciclos ambientales, es decir, las fases del ritmo biológico se corresponden con fases del ciclo ambiental, tal como puede ser el acople entre el inicio de actividad de un organismo diurno y el inicio de las horas de luz de un día. Este fenómeno se define como *sincronización* (ó *entrainment* en inglés). El ciclo ambiental que actúa como estímulo sincronizante ó *zeitgeber*, es un término que en alemán se interpreta como “dador de tiempo” (Pittendrigh, 1981; Sharma y Chandrashekar, 2005). Este término será usado en este trabajo para referirse a las variables que se evalúan como estímulos cíclicos sincronizantes.

Para demostrar el fenómeno de sincronización de un ritmo biológico respecto a un *zeitgeber* deben cumplirse cuatro criterios acorde a Moore-Ede (1982):

1. *Ausencia de otros estímulos que actúen como referencias temporales.* Este criterio asume que se está evaluando un ritmo endógeno, es decir, que sigue un libre curso (en condiciones constantes) en ausencia de estímulos ambientales. El organismo debe exponerse al *zeitgeber* para ocasionar la sincronización del ritmo, y posteriormente este ritmo deberá mantenerse en libre curso cuando el *zeitgeber* sea retirado.

2. *Control de periodo.* Cuando el organismo está expuesto a un zeitgeber con un periodo determinado, el ritmo circadiano debe ajustar la duración de su periodo hasta igualar el periodo del zeitgeber.
3. *Relación de fase estable.* La fase del ritmo circadiano observable debe mantener una relación estable con la fase del zeitgeber, es decir, la fase del ritmo debe depender únicamente del zeitgeber impuesto y no del tiempo del reloj.
4. *Control de fase.* Cuando el zeitgeber es retirado y el ritmo reanuda su libre curso, este debe iniciar manteniendo su fase como venía haciéndolo durante los días de exposición al zeitgeber, y no mostrar la fase que marcaba su reloj biológico antes de exponerse a la sincronización.

Cabe destacar que el fotoperiodo (ciclo luz:oscuridad) es la señal más reconocida y estudiada como sincronizador central de los ritmos biológicos con el ambiente en numeroso grupos animales (Meddle *et al.*, 2002; Saunders, 2008).

1.2.2. Sincronización al alimento

Si bien el fenómeno de la sincronización se ha estudiado usando principalmente estímulos de luz, diversas investigaciones evidencian la sincronización por alimento (Stokkan *et al.*, 2001; Stephan 2002; Schibler *et al.*, 2003; Landry *et al.*, 2007; Fuller *et al.*, 2008; Mistlberger, 2009; Bradley y Prendergast, 2014; Asher y Sassone-Corsi, 2015). Una de las conductas que se han estudiado para corroborar este fenómeno es la actividad anticipatoria al alimento observada en roedores como hámsteres, ratas y ratones. El consenso general para la explicación de esta conducta anticipatoria, es que el suministro de alimento en un horario restringido y/o establecido, puede actuar como un zeitgeber capaz de sincronizar el ritmo de actividad de estos organismos (Mistlberger, 2009).

Particularmente en ratas se ha descrito que la sincronización de la actividad anticipatoria al alimento exhibe las siguientes características (Mistlberger y Marchant, 1995 y Landry *et al.*, 2007):

1. Hay actividad locomotora que ocurre de manera anticipada al suministro de alimento, independiente de la actividad nocturna del organismo (hay dos ritmos de actividad claramente disociados)
2. El ritmo de actividad anticipatoria se mantiene con la misma fase aun cuando el estímulo alimenticio es retirado.
3. Cuando el alimento es suministrado sin horario restringido (*ad libitum* y siempre disponible) la actividad anticipatoria no se presenta.
4. En ratas con ablación del NSQ no se presenta el ritmo de actividad nocturno (ritmo normal de actividad); sin embargo éstas sí son capaces de presentar la actividad anticipatoria de manera sincronizada al alimento.

A partir de estas observaciones Mistlberger y Marchant (1995) establecen dos conclusiones importantes: la primera, es que este ritmo de actividad anticipatoria es

un verdadero fenómeno de sincronización, pues es independiente de la luz y presenta relación de fase estable y control de fase; y la segunda, que hay una estructura neural independiente del NSQ capaz de funcionar como oscilador, y que esta puede sincronizarse por estímulos alimenticios y exhibir ritmos circadianos. Esta estructura se denomina *oscilador sincronizable por alimento* (FEO, por sus siglas en inglés) y de acuerdo con Mistlberger (2009) constituye un mecanismo de verdadera sincronización que debe distinguirse de otros mecanismos hipotéticos que también podrían provocar actividad anticipatoria al alimento, pero que serían más parecidos a un reloj de arena (ritmos no autosostenidos ni endógenos). De la misma manera, la actividad anticipatoria como ritmo circadiano debe distinguirse de la actividad normal asociada a la alimentación. En los roedores, dicha actividad anticipatoria suele presentarse entre 1 y 3 horas antes del suministro de alimento y, se observa más claramente cuando el alimento es suministrado en horas de reposo natural del organismo (en este caso durante las horas de luz, ya que son organismos nocturnos).

La ubicación anatómica del oscilador (u osciladores) sincronizable(s) por alimento sigue discutiéndose. De acuerdo con las hipótesis propuestas, este oscilador podría localizarse puntualmente en el sistema nervioso central, pero también es posible que exista un conjunto de osciladores en órganos periféricos que cumplan esta función. Entre las estructuras periféricas el principal órgano señalado como responsable de la sincronización por alimento es el hígado (Stokkan *et al.*, 2001); no obstante, evaluando diversas hormonas implicadas en la señalización que regula la expresión de los ritmos circadianos, Schibler y colaboradores (2003) consideran que el tracto gastrointestinal (estómago e intestinos) también tendrían una función relevante. Por otro lado, en el contexto del sistema nervioso central, las estructuras que se han relacionado con la sincronización por alimento en ratas y ratones son el núcleo hipotalámico dorsomedial, el núcleo talámico paraventricular y el núcleo parabraquial (Stephan, 2002). Dentro de estos se concede menor relevancia al núcleo talámico paraventricular, debido a que su ablación no impide que se expresen ritmos robustos de actividad anticipatoria al alimento (Landry *et al.*, 2007). En contraste se ha encontrado evidencia de que el núcleo hipotalámico dorsomedial de ratones contiene un oscilador que se sincroniza por el alimento, y que en ratones arrítmicos es capaz de recuperar la fase y sincronizarse a un patrón de alimentación y no a un fotoperiodo, por lo que se postula como la estructura del sistema nervioso central en la que más probablemente podría encontrarse el FEO (Fuller *et al.*, 2008).

La importancia del alimento como un zeitgeber también ha sido destacada por Bradley y Prendergast (2014), considerándolo una referencia ambiental más potente que otras referencias no lumínicas. Damiola y colaboradores (2000) enfatizan su fuerte capacidad de sincronizar la expresión circadiana de genes en el hígado, en contraste con el efecto imperceptible que este zeitgeber tiene en las neuronas del NSQ. Por otro lado, las hipótesis sobre el papel central que ejercen los osciladores periféricos cuando el alimento es restringido han cobrado fuerza, pues son estos y no el NSQ quienes alinean su fase a un patrón de alimentación sincrónica (Lamia *et al.*, 2008).

Los osciladores sincronizables por alimento podrían ser también responsables de la regulación directa de algunos ritmos biológicos, particularmente los ritmos digestivos y metabólicos, que serían sincronizados por los ciclos de luz-oscuridad sólo de manera indirecta (Landry *et al.*, 2007).

Dieta y efectos metabólicos

La alimentación puede afectar los ritmos circadianos a través del efecto de la dieta en el metabolismo, fenómeno recientemente explicado por Chavan y colaboradores (2017). Esto se debe a que la ritmicidad de los genes del reloj puede verse afectada por variables como los niveles de glucosa y de ácidos grasos, así como la proporción AMP/ATP y NAD⁺/NADH. Cuando se afecta la transcripción de los genes del reloj como CRY y PER, esto se ve reflejado en los ciclos metabólicos del organismo. Ejemplos de este fenómeno se han visto en roedores. Dietas asincrónicas pueden modificar la homeostasis de la glucosa en ratones mediante la interacción con los relojes periféricos (Rudic *et al.*, 2004). También se ha demostrado que alrededor del 15% del transcriptoma del hígado se expresa de manera circadiana, donde la manipulación del patrón de alimentación puede regular la expresión de los genes correspondientes (Vollmers *et al.*, 2009). Damiola y colaboradores (2000) destacan la importancia del patrón alimentario en la relación entre el metabolismo y los relojes circadianos. De acuerdo con un estudio realizado con ratones, el vínculo entre el reloj central y el reloj del hígado puede romperse mediante la restricción temporal de la alimentación, lo que sugiere que esta restricción no es capaz de afectar al reloj maestro (el NSQ en este caso), pero sí a un oscilador periférico, lo que tendría efectos en la ritmicidad circadiana metabólica. Por otro lado, el estado nutricional y metabólico de los organismos, así como las condiciones que afectan las células de forma epigenética, también se han considerado como factores responsables de la plasticidad intrínseca del sistema circadiano, incidiendo en la expansión o restricción de la transcripción de los genes circadianos controlados por el reloj (Asher y Sassone-Corsi, 2015).

Interacción entre la sincronización a la luz y alimentación restringida

La relación que existe entre los ciclos de luz y la alimentación restringida como zeitgebers se ha investigado principalmente en los ritmos circadianos de la actividad locomotora de roedores, en los que presenta las siguientes características:

1. Cuando el alimento se suministra en las horas de reposo de los organismos, hay una sincronización por parte del *oscilador sincronizable por alimento*, y se observa un ritmo de actividad anticipatoria independiente al que regula el NSQ, marcapasos principal (Damiola *et al.*, 2000).

2. La expresión de la actividad anticipatoria al alimento refleja una interacción entre dos elementos: por un lado las estructuras anatómicas del sistema nervioso que se sincronizan al patrón de alimentación impuesto, y por otro lado el NSQ que inhibe la actividad diurna en los roedores nocturnos. Este ritmo de actividad anticipatoria es capaz de ajustar su fase ante diferentes fotoperiodos, lo que se interpreta como una adaptación a la estacionalidad que caracteriza la duración del día y la noche a lo largo de un año (Bradley y Prendergast, 2014).

3. El oscilador sincronizable por alimento está acoplado cercanamente al NSQ, ya que la fase de la actividad anticipatoria al alimento se retrasa o adelanta ajustándose a los respectivos cambios en ciclos de luz-oscuridad impuestos a ratones (Pendergast y Yamazaki, 2014).

Adicionalmente se ha descubierto un oscilador sensible a la metanfetamina, cuyas señales también regulan los ciclos de actividad locomotora. Este oscilador no se ha identificado anatómicamente y podría ser el mismo que el oscilador u osciladores sincronizables por el alimento. En resumen, el ritmo circadiano de actividad locomotora es controlado por osciladores que responden a tres señales ambientales: la luz sincroniza al NSQ, el alimento al oscilador sincronizable por alimento y la metanfetamina revela las señales de salida del oscilador denominado MASCO por su nombre en inglés, *methamphetamine sensitive circadian oscillator* (Pendergast y Yamazaki, 2014).

1.2.4. Fenómenos a considerar al evaluar la sincronización

Algunos fenómenos permiten distinguir cuándo un ciclo ambiental actúa realmente como sincronizador y cuándo se trata de un estímulo capaz de afectar la forma del ritmo pero incapaz de lograr la sincronización (Moore-Ede, 1982), tales como:

- a) *Coordinación relativa*. Ocurre cuando el ciclo ambiental no tiene la fuerza suficiente para sincronizar un ritmo; sin embargo, puede ejercer un cierto grado de control de fase. Un ritmo con coordinación relativa al ser graficado en un actograma se asemeja a un ritmo circadiano en libre curso (su periodo no es exactamente de 24 horas), pero presenta la cualidad de acortar o alargar su periodo en diferentes fases. Podría ocurrir cuando un organismo es sometido a un fotoperiodo en el que el contraste de intensidad lumínica entre la fase oscura y la fase luminosa no es muy grande.
- b) *Enmascaramiento*. Ocurre cuando al aplicar el estímulo ambiental cíclico, el ritmo del organismo iguala su periodo al del ciclo externo y mantiene una relación de fase pero, al ser retirado dicho estímulo ambiental, el ritmo empieza a correr en libre curso con la fase impuesta por el marcapasos biológico, y no con la que se trató de imponer con el estímulo ambiental cíclico.
- c) *Rango de sincronización*. Se refiere al intervalo de periodos (duración mínima y máxima) a las que el oscilador endógeno puede sincronizarse. Por ejemplo,

suponiendo que el periodo mínimo al que puede sincronizarse un organismo es de 21 horas, al intentar sincronizar uno de sus ritmos biológicos a un ciclo ambiental con un periodo de 20 horas (periodo fuera de su rango), no se logrará la sincronización.

- d) *Días transitorios*. Más que un problema de sincronización, los ciclos transitorios o días transitorios se observan cuando un ritmo circadiano con una determinada fase es sometido a un estímulo que le impone un cambio de fase; sin embargo, el cambio de fase no se aprecia inmediatamente, sino hasta después de varios ciclos en los que el periodo puede variar, hasta alcanzar un nuevo estado estable (Enright, 1981).
- e) *Post efectos*. En inglés este fenómeno se conoce como *aftereffects* y fue reconocido por Pittendrigh en 1960 (Moore-Ede, 1982). Se refiere a la influencia que puede tener el acondicionamiento previo del organismo (por ejemplo el fotoperiodo o intensidad de luz en su mantenimiento), antes de evaluar alguno de sus ritmos circadianos. El ritmo puede estar influido por las condiciones hasta 100 o más días previos a su evaluación, pero los efectos se ven posteriormente, de ahí su nombre.

1.3. Estudio de los ritmos circadianos en anfibios

Desde que la cronobiología surgió como disciplina, se han estudiado diversos grupos de invertebrados y vertebrados, con una relativa baja atención hacia los anfibios. En este último grupo, los estudios se han centrado principalmente en los anuros entre los que destacan las especies *Xenopus laevis*, *Rana catesbeiana* y *Rana pipiens* (Wright, 2002). En urodelos, son muy limitados los estudios realizados, sin haber reportes a la fecha sobre el ritmo de actividad locomotora en ajolotes y menos aún en *Ambystoma mexicanum*.

Los estudios sobre ritmos circadianos realizados en anfibios se han enfocado principalmente al análisis de las estructuras que funcionan como marcapasos principal, y se establece que son tres las más asociadas con la ritmicidad circadiana: el ojo (específicamente la retina), la glándula pineal y el NSQ, cada uno con un papel de distinta importancia dependiendo de la especie. En general, se reconoce que los anfibios anuros presentan fotorreceptores extrarretinales (en el cerebro y la glándula pineal) que podrían tener una función relacionada con los ritmos circadianos, y particularmente la retina y el NSQ han sido señalados como osciladores, este último como marcapasos principal de *Xenopus laevis* (Yoshikawa y Oishi, 1998). En una revisión de Bertolucci y Foà (2004), se reporta que dentro del complejo pineal de los anuros existe además una estructura autónoma llamada órgano frontal, que en *Rana esculenta* tiene función secretora involucrada en la reproducción anual y, en *Rana clamitans* es capaz de sincronizarse a la luz.

Otras líneas de investigación en anuros se han centrado en las oscilaciones de la melatonina plasmática y ocular, así como en los cambios hormonales que ocurren en

la metamorfosis y las variaciones en los ritmos circadianos que la acompañan (Wright, 2002). Cirugías como la oftalmectomía señalan la contribución de los ojos en las concentraciones de melatonina plasmática en forma circadiana (Wright *et al.*, 2006). También se ha estudiado cómo la expresión circadiana de las hormonas tiroxina y la melatonina cambia en las etapas de la metamorfosis (Wright, 2004). Cabe señalar la importancia de estos hallazgos en la comprensión del ciclo de vida de especies neoténicas como *Ambystoma mexicanum*, ya que la ausencia de la metamorfosis está ligada a la hormona tirotrópica (Galton, 1992).

En urodelos se conoce muy poco sobre los ritmos circadianos. Los principales estudios han descubierto la relevancia ecológica de estos ritmos, ya que en el medio acuático y terrestre modulan el comportamiento, la actividad locomotora, la reproducción, el metabolismo y la actividad sexual de los organismos, entre otros aspectos, información generada principalmente en tritones europeos y japoneses (Oishi *et al.*, 2004). En el tritón japonés, hay evidencia de que dependiendo de la etapa del desarrollo y la estación del año pueden estar más activos durante el día o la noche (Nagai y Oishi, 1998). También se ha visto que el fotoperiodo afecta la actividad respiratoria de los tritones lisos, pues aumenta a la hora en que la temperatura es más alta o hay menos oxígeno disuelto (Halliday y Worsnop, 1977). Dentro de la familia Ambystomatidae, se ha reportado que en la salamandra *Ambystoma tigrinum* existen fotorreceptores pineales en larvas y adultos que les permiten orientarse por medio del sol a modo de compás incluso en días nublados cuando el disco solar no es visible directamente (Taylor y Adler, 1973; 1978). Oishi y colaboradores (2004) refieren una elevada variación interindividual en la actividad locomotora de los ajolotes *Ambystoma mexicanum*, sin establecer conclusiones al respecto. Robles (2011) menciona de manera particular, que un ajolote mayor a 7 meses de edad presenta un ritmo significativo de la actividad locomotora. No obstante, a la fecha, el conocimiento de la ritmicidad circadiana en *A. mexicanum* es limitado.

1.4. Organismo de estudio

1.4.1 Biología del ajolote

Ambystoma mexicanum (Shaw, 1798), conocido comúnmente como ajolote (o axolotl por su nombre en lengua náhuatl) es un anfibio endémico de la Cuenca del Valle de México, originario de los lagos de Chalco y Xochimilco (Brandon, 1989). Se clasifica dentro de la clase Amphibia, en el orden Caudata (Scopoli, 1777) que agrupa los anfibios urodelos, conocidos como salamandras o tritones.

Desde hace más de dos siglos, los ajolotes han llamado la atención de los investigadores. A principios del siglo XIX el naturalista alemán F. A. von Humboldt llevó los primeros ajolotes a Europa para ser estudiados científicamente (Anaya, 1998). Posteriormente, el zoólogo Auguste H. A. Duméril describió el orden Urodela de anfibios caudados actuales, y recibió ejemplares de *A. mexicanum* en París (Reib

et al., 2015; Casas, 2003). La especie comenzó a ser reproducida en cautiverio, favoreciendo el estudio de su desarrollo (Duméril, 1872).

Descripción general

El cuerpo del ajolote es robusto y llega a medir 132 mm de la boca a la cloaca en etapa adulta neoténica. La aleta caudal inicia dorsalmente posterior a la cabeza y hasta el final de la cola, que va haciéndose más delgada desde la cloaca a la punta. La cabeza tiene de 33 a 37 mm de ancho (su cabeza es más ancha que larga). La piel es lisa en casi todo el cuerpo, pero en la cabeza puede haber algunas glándulas con poros. La coloración de la piel varía entre tonalidades verdes grisáceas a cafés en la parte dorsal, siendo de un tono más claro en el vientre. La boca tiene 126 dientes maxilares y premaxilares, mientras que los vomeropalatinos están separados y van de 18 a 20 por lado. El cuerpo presenta pliegues costales. Los dedos son de longitud más o menos corta y con terminación en punta. (Aguilar-Miguel, 2005). Hay diferenciación sexual, ya que solo el macho presenta protuberancias a ambos costados de la cloaca. Como otros miembros de la familia Ambystomatidae, destaca el potencial de la especie de respirar por cuatro vías: branquias, pulmones funcionales, piel y respiración bucofaríngea (Griffiths y Thomas, 1992). También se ha reportado la formación de una biopelícula microbacteriana en la piel de los ajolotes (García, 2013), aspecto que requiere de investigación para determinar si esto le confiere algún tipo de protección o si dichas bacterias son potencialmente patógenas.

El ajolote *A. mexicanum* es una especie neoténica, es decir, los adultos permanecen con caracteres juveniles y mantienen sus branquias al alcanzar su madurez reproductiva (Aguilar-Miguel, 2005). De acuerdo con los grados de neotenia compilados por Wakahara (1996), el ajolote se considera un animal “neoténico obligado inducible” ya que en la naturaleza no suele completar nunca su metamorfosis, pero en condiciones de laboratorio se puede inducir su desarrollo a estadio adulto con tratamiento hormonal. La metamorfosis en organismos silvestres puede ocurrir bajo condiciones de estrés severo ambiental (Smith, 1969). Se ha propuesto que este urodelo no alcanza la metamorfosis debido a la producción de niveles bajos de la hormona tirotrópica T_3 , que a su vez no se eleva por la escasa activación de la forma precursora T_4 hacia T_3 , además de presentar pocos receptores a esta hormona cuando el organismo alcanza la etapa adulta (Galton, 1992; Rosenkilde y Ussing, 1996; Groef *et al.*, 2018).

1.4.4. Importancia de *Ambystoma mexicanum*

La relevancia de estudiar al ajolote abarca una diversidad de aspectos. Este anfibio es un modelo científico ideal para realizar estudios de biología del desarrollo, ya que las etapas de su desarrollo embrionario desde huevo hasta juvenil son muy evidentes y se han descrito con detalle, de modo que es posible seguir dicho proceso *in vivo*

relativamente fácil (Schreckenber y Jacobson, 1975; Nye *et al.*, 2003; Bordzilovskaya *et al.*, 1989). Además su condición neoténica ha permitido describir detalladamente los procesos hormonales de la metamorfosis. Se ha reportado la inducción de la metamorfosis completa no solamente por la hormona T₃, como es de esperarse (Sawin *et al.*, 1978), sino por combinaciones de T₄ y corticosteroides (dexametasona), actuando de manera sinérgica en el proceso de metamorfosis en estos anfibios (Kühn *et al.*, 2004). También se ha descrito el papel que tienen otras hormonas en dicho proceso, como la hormona liberadora de hormona luteinizante, que induce la liberación de tirotrpinas y testosterona en ajolotes machos juveniles (Jacobs y Kühn, 1988).

Otro aspecto que ha recibido particular interés en estudios biomédicos y biotecnológicos es su capacidad de regeneración tisular, característica que se ha observado incluso en su estadio adulto, y que incluye una variedad de tejidos incluido el tejido nervioso (Roy y Gatien, 2008). Se ha tratado de establecer una relación entre la capacidad regenerativa y aspectos relacionados con el desarrollo y envejecimiento para aplicar este conocimiento a la medicina humana; por ejemplo para establecer si hay una relación entre la disminución de la hormona de crecimiento (que disminuye con el envejecimiento) y la capacidad regenerativa, aunque evaluaciones previas en ajolotes han descartado esta causalidad (Tassava, 1983).

Respecto a los aspectos genéticos, el conocimiento de su genoma ofrece oportunidades para estudios médicos y moleculares, ya que de acuerdo con la revisión de Smith *et al.* (2009), el genoma del ajolote es complejo y contiene intrones que son 10 veces más largos que los del genoma de otros vertebrados, y sus genes se estiman 5 veces más largos que los del ser humano, conteniendo además múltiples elementos transcritos funcionales. Guelke *et al.* (2015) han reportado un set de genes de referencia del genoma del ajolote y sus respectivos niveles de expresión, algunos de ellos posiblemente involucrados en la regeneración tisular (genes ODC y RPLP0). A este trabajo se suma la descripción de secuencias a una escala mayor (paisajes transcripcionales) realizada por Caballero-Pérez *et al.* (2018). Ante tal información genética, Haas y Whited (2017) advierten sobre la importancia de generar nuevos datos y analizarlos sin sesgos por parte del conocimiento que se tiene en el humano. Como ejemplo aplicado en investigación biomédica, se han descrito los efectos de algunas mutaciones con relevancia médica; una de ellas en el gen letal recesivo *c* el cual en estado de homocigosis ocasiona una malformación en el corazón que impide que el organismo termine de desarrollarse (Lemansky, 1973).

No obstante la importancia de esta especie, a partir de 2010 *A. mexicanum* está considerado como especie en peligro crítico de extinción en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) y sujeta a protección especial por la NOM-059-SEMARNAT-2010 por parte de la legislación mexicana. Originalmente el ajolote cumplía un papel ecológico relevante en el ecosistema acuático de los canales de Xochimilco, siendo el depredador tope de la trama trófica (Zambrano *et al.*, 2010); no obstante, este nicho ecológico

prácticamente ha sido desplazado por la introducción de peces exóticos como carpas (*Cyprinus carpio*) y tilapias (*Oreochromis niloticus*), los cuales depredan los huevos del ajolote y compiten con los adultos por los recursos (Alcaraz *et al.*, 2015). Otro factor que ha contribuido significativamente a la disminución de sus poblaciones es su valor económico, pues el ajolote también ha sido apreciado por la medicina tradicional e incluso para el consumo humano (Bartra, 2011).

Aunado a lo anterior, el área de distribución del ajolote ha disminuido drásticamente debido a la fragmentación de su hábitat, ya que originalmente en la cuenca del Valle de México existía un único lago, que al pasar por un proceso de desecación se fragmentó en 5 lagos más pequeños, siendo Xochimilco uno de ellos (Palerm, 1973), donde a la fecha la pérdida de canales debido a su relleno limita la distribución de la especie. No obstante, la mayor amenaza para el ajolote ha sido la explotación excesiva de los manantiales de Xochimilco, del que actualmente queda solo un remanente de canales que son rellenados con aguas tratadas (DGCOH, 2005), por lo que la calidad del agua no es favorable para el ajolote al presentar numerosos contaminantes y altos niveles de materia orgánica (PAOT, 2012; Ponce de León *et al.*, 2017). Este conjunto de factores han mermado la población de ajolotes y después de un análisis de viabilidad, Zambrano *et al.* (2007) han estimado su probable extinción en su ambiente natural a partir del año 2027.

Protagonista de muchas leyendas y mitos, así como de descripciones artísticas de los naturalistas que lo estudiaron, el ajolote también es un símbolo de identidad en la cultura de México y particularmente de Xochimilco. Ha inspirado desde tiempos prehispánicos a los habitantes del Valle de México y dejado un legado en nuestro país desde perspectivas míticas hasta históricas (Bartra, 2011).

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ajolote *Ambystoma mexicanum* es una especie sujeta a protección especial y requiere de mantenimiento en cautiverio para evitar su extinción. El comportamiento de los organismos es un factor muy importante para su sobrevivencia en el medio silvestre, pues se tiene conocimiento de intentos fallidos de reintroducción de especies acuáticas debido a cambios en los patrones conductuales de los organismos mantenidos en cautiverio, que carecieron de cuidados parentales o de aprendizajes naturales que experimentarían en su ambiente silvestre (Shumway, 1999). En este sentido, la regulación circadiana del comportamiento cumple un papel importante en el desarrollo, en el contexto ecológico y adaptativo, lo que se ha evidenciado en numerosas especies, por lo que es deseable la comprensión de los ritmos circadianos de la actividad locomotora y cómo esta es afectada por diferentes variables externas, como la intensidad de luz o la disponibilidad de alimento.

En su ambiente natural, *Ambystoma mexicanum* cumplía una función importante como depredador nativo de los humedales de Xochimilco. Sin embargo, la disminución drástica que ha presentado su población en los últimos años hace que la labor de mantener la especie en cautiverio cobre especial relevancia para su conservación. Si bien se ha logrado mantener y reproducir ajolotes en cautiverio, se desconoce el patrón de actividad circadiana característico de los ajolotes, ni el efecto que las diferentes variables de mantenimiento podrían tener en este comportamiento. En este sentido, es importante conocer cómo las condiciones de mantenimiento, entre ellos el fotoperiodo y los programas de alimentación que se imponen en el laboratorio, pueden afectar la conducta circadiana de la especie. En la medida que se conozca el comportamiento de los ajolotes y se implementen estrategias para optimizar su mantenimiento *ex situ*, se contribuirá a reforzar las posibilidades de que en un futuro esta especie pueda ser reintroducida exitosamente en su ambiente natural.

El presente trabajo representa un punto de partida para entender la ritmicidad circadiana de la actividad locomotora de los ajolotes, por lo que el principal reto es determinar si hay una regulación circadiana de esta actividad y cómo la sincronización de este ritmo puede verse afectada ante distintas combinaciones de estímulos externos, particularmente la intensidad lumínica y el patrón de alimentación.

3. HIPÓTESIS

En vertebrados, la ritmicidad circadiana de la actividad locomotora ha sido descrita principalmente en mamíferos, (Menaker *et al.*, 1997; Mistlberger, 2009) y son limitados los estudios en anfibios (Oishi *et al.*, 2004). Si bien la sincronización de los ritmos circadianos se ha estudiado usando principalmente estímulos de luz (Storch y Weitz, 2009; Geiger *et al.*, 2015), diversas investigaciones evidencian la sincronización por alimento (Damiola, 2000; Stokkan *et al.*, 2001; Stephan 2002; Fuller *et al.*, 2008; Bradley y Prendergast, 2014).

Partiendo de la premisa de que la actividad locomotora de *Ambystoma mexicanum* muestra un ritmo circadiano y que su sincronización también obedece a los estímulos ambientales de luz y disponibilidad de alimento, se esperaría que:

Si el alimento no ejerce sincronización, entonces se espera ver un patrón de actividad locomotora persistente en oscuridad continua que sólo esté asociado al fotoperiodo de acondicionamiento, sin exhibir incremento en la actividad regular asociado a la alimentación.

Si la intensidad de luz baja no es suficiente para lograr la sincronización y el alimento tiene mayor fuerza, entonces se espera ver el incremento de la actividad durante el libre curso asociado al alimento (en condiciones sincrónicas) o patrones de actividad arrítmica (en condiciones asincrónicas).

La condición experimental de luz baja con alimentación asincrónica se asemeja a las condiciones del ambiente natural del ajolote, por lo que particularmente para esta condición se espera observar un ritmo circadiano evidente en la actividad locomotora de los juveniles.

4. OBJETIVO

Objetivo general:

- Caracterizar el ritmo de actividad locomotora en juveniles de *A. mexicanum*.

Objetivos particulares:

- Determinar si la actividad locomotora presenta ritmicidad circadiana.
- Evaluar el patrón de alimentación como estímulo sincronizante (zeitgeber).
- Determinar la importancia de la intensidad de la luz en la sincronización de la actividad locomotora.
- Comparar la relevancia de ambos estímulos actuando como zeitgebers.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención de organismos de estudio

A partir de ejemplares adultos de la colonia de *A. mexicanum* de la Unidad de Análisis Ambiental (UNAAMB) de la Facultad de Ciencias de la UNAM, se llevó a cabo su reproducción controlada acorde al protocolo de Robles-Mendoza (2011). Este proceso se llevó a cabo a partir de la primera semana de febrero de 2016, periodo que coincide con la temporada invernal cuando los machos muestran notoriamente una hinchazón de las gónadas a ambos lados de la cloaca, que indica el momento más propicio para la reproducción. Para propiciar el ritual de cortejo por los machos se seleccionaron una hembra y dos machos sexualmente maduros. Los organismos se colocaron en un acuario de 80 L acondicionado para los eventos reproductivos. El acuario se equipó con piedras ligeramente rugosas, para facilitar la adhesión de los espermatozoides depositados por los machos, así como con mechones de rafia verde, que simulan la vegetación acuática y sirven a la hembra como medio de sujeción para facilitar la introducción de los espermatozoides en su cloaca. A la vez, las tiras de rafia facilitan la ovoposición, ya que es ahí donde la hembra coloca los huevos y donde estos quedan adheridos.

Debido a que la alimentación de los ajolotes y la actividad humana en los alrededores del acuario pueden perturbar el cortejo, no se suministró alimento durante el evento reproductivo, y el acuario se mantuvo tapado con plástico negro, al que se le hicieron

dos cortes plegables a modo de ventana, a través de los cuales se revisó cada dos horas la conducta reproductiva de los organismos, hasta las 19:00 hrs. En estas revisiones se verificó la deposición de espermátóforos así como señales del inicio de la ovoposición.

Terminada la ovoposición (que duró entre 3 y 5 días), los huevos se distribuyeron en cuatro acuarios de eclosión mantenidos a una temperatura de 19 ± 1 °C y aireación suave. El desarrollo embrionario se monitoreó diariamente, mediante la revisión al microscopio estereoscópico de una muestra de 5 huevos tomados al azar. A lo largo de las 3 semanas que duró el desarrollo embrionario, el seguimiento de los estadios de desarrollo se realizó acorde a las etapas descritas por Schreckenber y Jacobson (1975). Una vez ocurrida la eclosión, se aseguró que el mantenimiento y crecimiento de las larvas y juveniles estuvieran guiados por los procedimientos estandarizados que se detallan a continuación.

5.2. Mantenimiento y alimentación de los organismos

5.2.1. Mantenimiento

El mantenimiento de los organismos se realizó en el área de Bioensayos de la UNAAMB; se fijó un fotoperiodo LO 12:12, con encendido y apagado de la luz a las 7:00 y a las 19:00 h, respectivamente, y una temperatura ambiental de 17 °C. En todo momento los organismos se mantuvieron en solución Holtfreter (SH) al 100%, medio ideal para el desarrollo adecuado de las larvas y juveniles de *A. mexicanum* (Asashima *et al.*, 1989), pues al ser isosmótico con el medio interno de los organismos, éstos invierten menos recursos energéticos en la osmorregulación, que son canalizados hacia el crecimiento (Robles-Mendoza *et al.*, 2009). El mantenimiento de los organismos se llevó a cabo en acuarios de 20 L de capacidad, con un volumen de 16 L de SH. Se inició con una densidad de 30 larvas por acuario de mantenimiento, y a medida que las larvas aumentaron de edad y talla, se redistribuyeron en acuarios con menor densidad de organismos para disminuir el estrés por falta de espacio y evitar el canibalismo, común en estas etapas de desarrollo.

Los acuarios contaron con aireación por piedras difusoras y con filtros de caja con carbón activado, para mantener bajas las concentraciones de amonio en los acuarios. Semanalmente se tomó una muestra del agua de los acuarios para verificar que los niveles de amonio se mantuvieran ≤ 0.3 mg NAT/L; en caso de ser necesario y para mantener una mayor calidad del agua, se realizaron recambios parciales con la solución Holtfreter.

5.2.2. Alimentación

La alimentación de las larvas y juveniles durante el periodo de mantenimiento se realizó acorde al protocolo descrito por Robles-Mendoza (2011). Las larvas de *A.*

mexicanum tienen una longitud menor a 1 cm al nacer, por lo que requieren que su alimento vivo tenga una talla adecuada para ser ingerido, además de moverse por el acuario para ser detectado por las larvas. Los nauplios del crustáceo *Artemia salina* cumplen con estas características y fue el alimento suministrado, además de aportar las proteínas y ácidos grasos requeridos por las larvas en esta etapa de crecimiento. Diariamente se realizó la descapsulación de quistes de artemia para suministrar a las larvas la cantidad de nauplios idónea de acuerdo con su edad: desde 500 nauplios los primeros días después de la eclosión, hasta 3000 nauplios a los 45 días de edad. A partir de un mes de edad la dieta de las larvas se complementó con artemias adultas (aproximadamente 100 por ajolote), alimento vivo adquirido con distribuidores comerciales. Del mismo modo se adquirieron lombrices acuáticas (*Tubifex sp.*) y charales (*Chirostoma sp.*) de la menor talla disponible en el mercado, que fueron complementos a la dieta a partir de los 45 y 60 días, respectivamente; en esta edad los ajolotes ya habían desarrollado las cuatro extremidades, por lo que se consideran juveniles. El *Tubifex sp.* y los charales se adquirieron con tres días de anticipación a su suministro como alimento para ser sometidos a un tratamiento preventivo, que consistió en desinfección con verde de malaquita y azul de metileno. De esta manera se eliminaron posibles patógenos y parásitos externos para evitar su transmisión a los organismos experimentales. A los tres meses de edad se les suministró pollo orgánico crudo para complementar su requerimiento proteico, cortado en trozos de un tamaño adecuado para la boca de los juveniles.

5.3. Diseño experimental

5.3.1. Condiciones experimentales

El efecto de la intensidad lumínica y el patrón de alimentación en el ritmo de actividad de *A. mexicanum*, se evaluó a partir de cuatro experimentos, combinando estas dos variables (Tabla 1):

- ❖ Variable 1: Intensidad lumínica. Se evaluaron dos intensidades:
 - **A** (alta): alrededor de 650 luxes (11.7 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$).
 - **B** (baja): alrededor de 130 luxes (2.34 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$).
- ❖ Variable 2. Patrón de alimentación. Se evaluaron dos patrones:
 - **S** (sincrónico): alimentación restringida a la misma hora todos los días.
 - **As** (asincrónico): alimentación a distintas horas cada día.

Tabla 1. Condiciones experimentales y su combinación de variables.

	Int. lum.	Alta	Baja
Alim.			
Sincrónica		A-S	B-S
Asincrónica		A-As	B-As

La actividad locomotora de los organismos de todas las condiciones experimentales se determinó tanto en fotoperiodo LO 12:12 como en OO a fin de evidenciar el componente endógeno del ritmo circadiano. Los organismos provenientes de cada grupo experimental, en condiciones post-absortivas (ayuno de 24 h), se colocaron en el Sistema de Registro de Actividad Locomotora (RALM; ver sección 6.4) y se les mantuvo por un día (aclimatación previa) antes de iniciar los registros de actividad. En cada condición, se establecieron periodos de grabación de 6 días en LO y 4 días en OO. En cada condición experimental se realizaron los registros de 12 organismos por lo que en total se utilizaron 48 ajolotes.

5.3.2. Selección de organismos para las condiciones experimentales

Una vez que los ajolotes alcanzaron los 8 meses de edad, se programaron los registros de la actividad locomotora de cada grupo experimental de manera secuencial. Los ajolotes de cada condición experimental (12 ejemplares por condición) se trasladaron desde la UNAAMB al cuarto de bioensayos del Laboratorio de Ecotoxicología de Organismos Acuáticos. Los organismos se colocaron en acuarios de vidrio de 20x40x30 cm, de capacidad de 20 L y con 16 L de SH. Los ajolotes se aclimataron durante una semana a las condiciones del patrón de alimentación de cada grupo experimental. De manera inicial, se eligieron 12 organismos en un intervalo de 119 a 126 mm de longitud total (121 mm LT promedio) de los acuarios de mantenimiento para iniciar los registros de la primera condición experimental. En los tres experimentos posteriores se seleccionaron organismos de talla similar pero de magnitud decreciente en cada grupo, asegurando que los organismos más pequeños continuaran creciendo y alcanzaran la talla requerida para cada uno de los experimentos faltantes.

Los organismos de cada grupo experimental se mantuvieron bajo condiciones fisicoquímicas similares a las descritas previamente en la etapa de mantenimiento (i.e. pH, temperatura, oxígeno disuelto). Los ajolotes de cada grupo experimental se alimentaron diariamente a razón de 100 artemias adultas/individuo acorde a su patrón de alimentación (sincrónico o asincrónico). Durante la semana de aclimatación se efectuaron dos recambios de agua parciales, del 50% del volumen de la SH de los acuarios para garantizar la calidad del agua.

5.4. Montaje y calibración del sistema de Registro de Actividad Locomotora (RALM) Omniaiva®

5.4.1. Descripción del sistema

El sistema RALM, diseñado *ex profeso*, es un sistema de circulación cerrado de cuatro niveles; los tres niveles superiores cuentan con cámaras donde se realiza la grabación de los ajolotes y, en el nivel inferior se instala un contenedor de agua con una bomba

sumergible para suministrar el agua a los acuarios de cada cámara, y donde se realizan recambios de agua y/o se regula el volumen de agua (SH), de ser necesario. El volumen total del sistema es de 54.5 L, incluyendo el agua de los acuarios, del contenedor y de la tubería de distribución (figura 4).

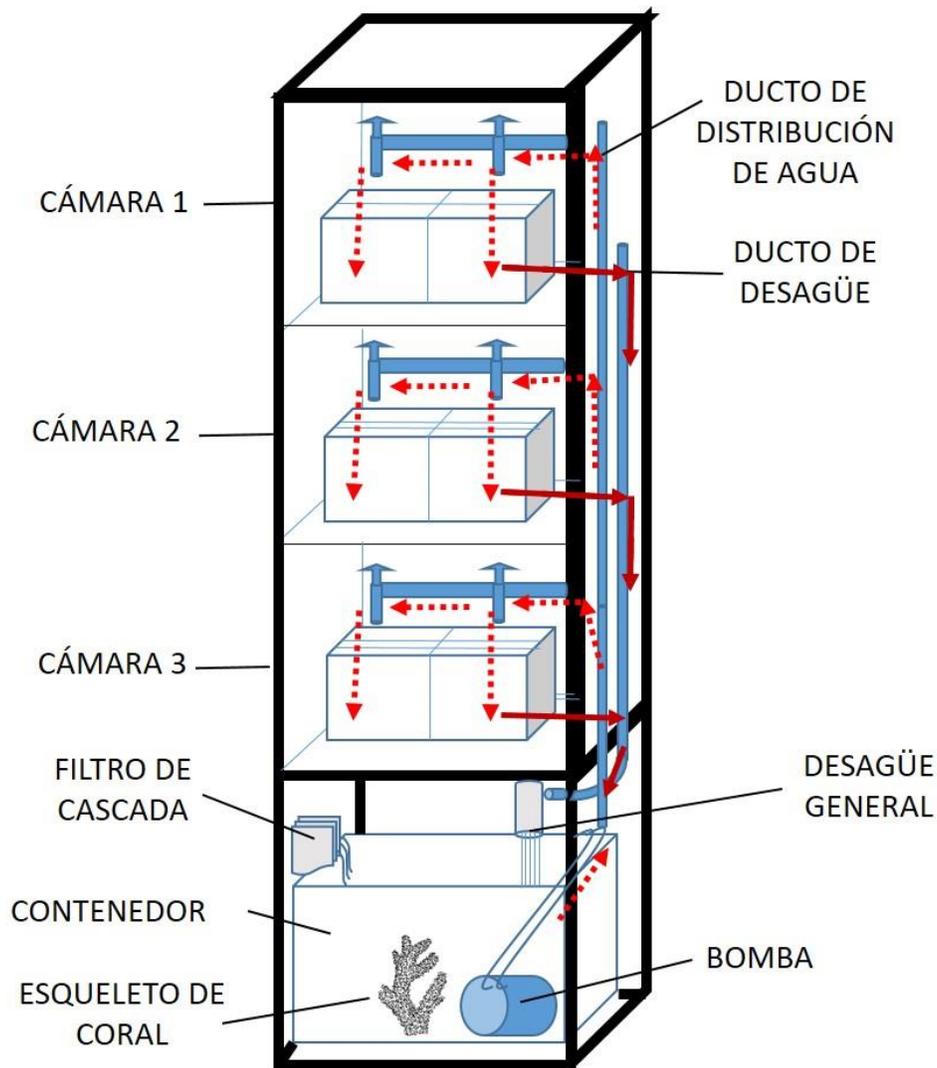


Figura 4. Esquema básico del sistema RALM. Las flechas rojas indican la recirculación del agua en el sistema cerrado. Las flechas rojo claro (punteadas) indican el flujo desde el contenedor hacia los acuarios, y las flechas rojo oscuro (continuas) indican el flujo desde el desagüe de los acuarios de vuelta al contenedor.

Los parámetros fisicoquímicos de oxígeno disuelto, temperatura y pH, así como los niveles de amonio, producto de la excreción nitrogenada de los organismos, se monitorearon y se regularon diariamente en el contenedor. Asimismo, se acondicionó un filtro de cascada para mantener bajos los niveles de amonio (≤ 0.3 mg NAT/L) y se colocó un esqueleto de coral para mantener valores de pH cercanos a 7.5 (intervalo de 7.0 a 8.0), recomendable para el mantenimiento de los ajolotes (Mena y Servin, 2014). El control de las condiciones fisicoquímicas del agua permitió mantener a los organismos en óptimas condiciones.

En cada cámara se instalaron dos acuarios de vidrio, de 15 x 15 x 30 cm cada uno, con un volumen total de SH de 5.7 L, dividido a la mitad por una malla plástica que impedía el paso de los ajolotes hacia el otro lado del acuario, lo que resultaba en dos espacios o “arenas” por acuario. En cada arena se colocó un ajolote de tal manera que se colocaron cuatro ajolotes por cámara o nivel y considerando los tres niveles, se evaluaron 12 organismos por condición experimental.

El flujo del agua (SH) en cada cámara del sistema se controló con válvulas laterales y con válvulas finas individuales para cada acuario. El flujo de la SH con estas últimas válvulas fue finamente ajustado previo a los registros experimentales, previendo que el sistema se mantuviera purgado de aire para evitar la formación de burbujas de aire que pudieran interferir con la grabación de imágenes al ser interpretadas como movimiento de los organismos. El flujo del agua a los acuarios se realizó a través de tubos de vidrio, cuyo extremo llegaba a una distancia muy próxima a la base del acuario, asegurando una circulación completa del agua en el acuario. Se eligió vidrio por su transparencia y su rigidez, con el fin de no interferir con la grabación de las cámaras de video, pues se desea que estas únicamente detecten a los ajolotes. El desagüe de los acuarios se ubica en la parte posterior de estos y fueron acondicionados con una malla de 1 mm de apertura para impedir la pérdida del alimento vivo (artemia adulta), además de servir como un filtro mecánico para contener los residuos generados y facilitar su eliminación.

Las cámaras del sistema cuentan con lámparas laterales con iluminación de luz blanca y roja; esta última se usó en la fase oscura del fotoperiodo y en las condiciones de OO. El sistema RALM cuenta también con temporizadores de luz para cada cámara (Stereon, modelo TEMP-310), lo que permite programar automáticamente el fotoperiodo deseado y un mejor control tanto de la luz blanca como de la roja, así como con un sistema regulador de la intensidad lumínica. Las cámaras de video (cámara tipo domo ojo de pez, 360°, modelo HDI20FE1, 1.7 mm, resolución 1080 p) se ubican en la pared superior de cada cámara del sistema, justo en el centro para abarcar las cuatro arenas y grabar la actividad de los cuatro ajolotes (Fig. 5).

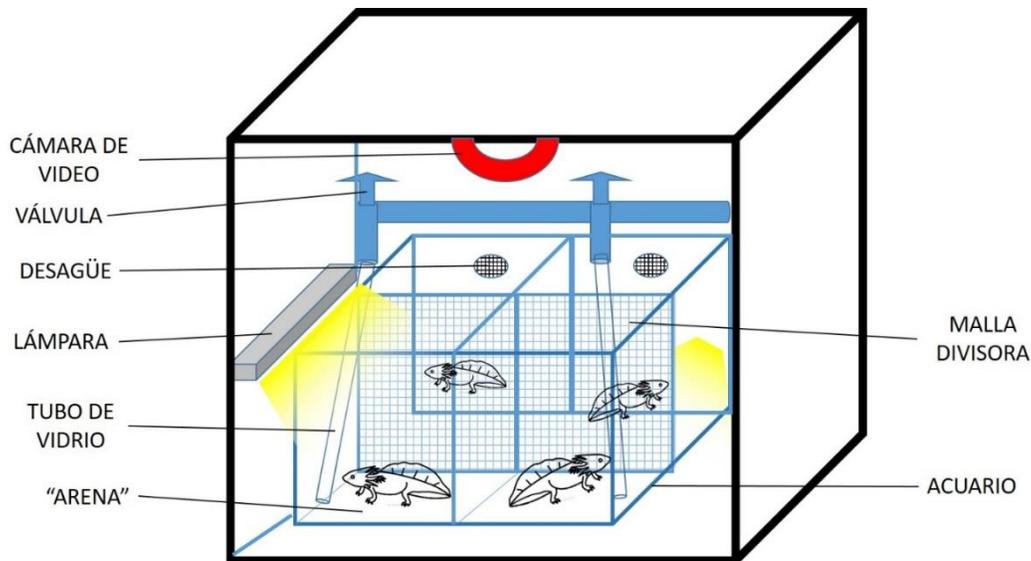


Figura 5. Esquema de una de las cámaras del sistema RALM OmniaIva.

Durante el periodo de registro en OO se observó que los ajolotes tendían a saltar en los acuarios y en ocasiones, saltar hacia una arena vecina. En todos los casos se registró la hora del evento y con la ayuda de los videos se verificó este momento, para devolver los ajolotes a su arena correspondiente. La ocurrencia de este comportamiento fue en promedio del 2% en todos los grupos experimentales. Después de observar estas conductas en las dos primeras condiciones experimentales, se implementó un “corral” de acetato que rodeara las paredes de los acuarios, para evitar en la medida de lo posible el escape o intercambio de los organismos.

Los ajolotes utilizados en cada prueba experimental se identificaron previamente, registrando sus rasgos corporales particulares para tener una referencia en caso de encontrar a dos o más ajolotes en una misma arena (evento muy fortuito) y así distinguirlos más fácilmente para regresarlos a su arena correcta.

5.4.2. Calibración y pruebas de registro y de alimentación

Los organismos de cada condición experimental se colocaron en los acuarios, donde la actividad locomotora se monitoreó de manera continua por las cámaras de video. Las cámaras de video están conectadas a un sistema de registro (ProVision ISR ®) y enlazada a una computadora en cuyo monitor se observa en tiempo real la actividad de todos los ajolotes, y permite controlar las condiciones de grabación. Los datos de video se guardan temporalmente en el sistema, desde donde son copiados a otros medios de almacenamiento o procesamiento de datos. Al término del periodo de grabación de cada condición experimental (44 días en total), los videos se respaldaron en un disco duro externo de 1 TB para su posterior procesamiento y análisis.

Previo a las pruebas y registros experimentales, se realizó la calibración del programa del sistema de registro en el sistema RALM junto con el programa de procesamiento de imágenes (Omnialva ®; diseñado para ambiente de MATLAB) con ajolotes de prueba. La calibración consistió en ajustar la sensibilidad del programa de Omnialva para detectar el movimiento de los organismos, delimitar el área o silueta que sería reconocida como “el ajolote”, eliminar el efecto espejo ocasionado por el reflejo de las paredes de los acuarios y ajustar el número de imágenes que se graban por segundo para obtener un video de tamaño apropiado para su procesamiento e interpretación; todo ello permitió evitar la detección de imágenes con movimiento no deseadas (como es el caso de las burbujas) que pudieran interferir o enmascarar los registros deseados.

De igual manera, se realizaron pruebas previas para determinar el alimento apropiado a suministrarse a los ajolotes como estímulo sincronizante. Este alimento debía cumplir las siguientes características: ser ingerido sin excepción durante todos los días que se suministrara de manera consecutiva y ser consumido en su totalidad durante un periodo máximo de dos horas a partir de su suministro. El alimento que cumplió con estas características fueron las artemias adultas.

La estrategia establecida para la alimentación de los ajolotes en el sistema de registro consideró los siguientes aspectos:

- El suministro de artemias adultas fue de 100 artemias por ajolote y el periodo de alimentación fue de máximo dos horas.
- Durante el periodo de alimentación, se interrumpió el flujo de agua de los acuarios para evitar su acumulación en la malla del orificio de desagüe y permitir su distribución homogénea.
- Al término del periodo de alimentación se retiraron las artemias no consumidas por los ajolotes, las cuales eran muy escasas y de pequeño tamaño, no detectadas por los organismos. De igual manera, se limpiaron las mallas con un cepillo fino para evitar la acumulación de cualquier resto orgánico.
- Una vez concluido el periodo de alimentación se reanudó el flujo de agua usando las válvulas laterales de cada cámara y se aseguró que no se presentaran burbujas de aire circulando.
- Durante los minutos que duró la maniobra del suministro de artemias (5 min) y el retiro del alimento excedente (3 min), se interrumpió la grabación para eliminar el registro de los movimientos externos y su interpretación en el análisis de los videos. Inmediatamente después de realizar estas maniobras o cualquier otra intervención se reanudó la grabación. .

5.4. Registros experimentales

5.4.1. Registro en fotoperiodo LO

Como se mencionó previamente (ver sección 5.3.2.), los ajolotes de cada condición experimental se aclimataron durante una semana previo a su transferencia al sistema de registro RALM. Durante este periodo, los organismos se mantuvieron bajo un fotoperiodo LO de 12 horas de luz blanca (a partir de las 7:00 h) y 12 horas de luz roja (oscuridad subjetiva para los ajolotes; a partir de las 19:00 h). Los ajolotes de cada grupo experimental continuaron con la alimentación diaria a razón de 100 artemias adultas/individuo acorde a su patrón de alimentación (sincrónico o asincrónico).

El alimento se suministró a una misma hora (11:00 h) para el patrón sincrónico (condiciones A-S y B-S) y, a horas diferentes cada día (16:00, 11:00, 19:00, 8:00, 15:00 y 9:00 h, respectivamente) para el patrón asincrónico (condiciones A-As y B-As). Dado que los ajolotes presentan una mayor actividad crepuscular-nocturna (Wells, 2007), para la condición sincrónica el alimento vivo se suministró a las 11:00 h por ser un horario comprendido dentro de las horas de luz, donde se asume un periodo mayormente de reposo para los organismos. Esto permite evaluar si hay sincronización por el estímulo del alimento, pues se espera un patrón de actividad distintivo en el actograma, asociado al suministro del alimento.

Después del periodo de aclimatación de una semana, los organismos de cada grupo experimental se midieron y pesaron antes de incorporarlos al sistema RALM a las 9:00 h y se mantuvieron durante un día de aclimatación al sistema, en condiciones de ayuno. Se tomaron los registros de longitud total (LT, cm), longitud patrón (LP, cm), peso húmedo total (PH, g) y rasgos corporales distintivos de cada organismo, tales como manchas atípicas de melanina, muescas en la cola, y cicatrices.

En el sistema RALM, se programaron los temporizadores de las tres cámaras para encender la luz blanca a las 7:00 h y cambiar a luz roja a las 19:00 h. Se configuró la intensidad de la luz de las lámparas con un regulador conectado a las mismas, y se fijó en su nivel más alto (650 luxes) para las condiciones de intensidad alta (A-S y A-As), mientras que para la intensidad baja (130 luxes) fue necesario cubrir las lámparas con cinta de aislar negra.

Posterior al día de aclimatación al sistema se realizaron los registros de actividad de los organismos durante 6 días. Los organismos se alimentaron diariamente de acuerdo al patrón de alimentación descrito previamente (sincrónico y asincrónico) y se monitorearon los parámetros fisicoquímicos de temperatura, oxígeno disuelto, pH y niveles de amonio para realizar acciones correctivas de ser necesario. De igual manera, se revisó la actividad general de los ajolotes en el monitor de la computadora para corroborar que cada ajolote se encontrara en su respectiva arena, ya que estos pueden saltar y caer en otras arenas.

5.4.2. Registro en fotoperiodo OO

Al término de los seis días de registro en fotoperiodo LO se modificó la programación de los temporizadores para que después de apagarse la luz blanca a las 19:00 h no volviera a encenderse hasta el onceavo día de registro a las 7:00 h. De esta manera, los ajolotes se mantuvieron por 4 días en fotoperiodo OO en luz roja, no detectada por los organismos (Grunsvén *et al.*, 2016) y sin alimentación; esto permitiría observar si a pesar de la ausencia de un patrón de alimentación fijo (condiciones A-S y B-S), los ajolotes mostraban alguna conducta particular y/o acondicionamiento asociado a las horas de alimentación de los días anteriores.

5.5. Procesamiento informático de los datos de registro

5.5.1. Procesamiento de videos por el software OA_Axolote en Matlab

Los videos de los organismos de las diferentes condiciones experimentales se respaldaron en formato .AVI, se copiaron y organizaron en carpetas en el disco duro de la computadora, creando una carpeta para cada condición experimental. En el programa MATLAB se ejecutó el paquete “OA_Axolote” (el software diseñado por Omniaiva). Este programa analiza cada video por medio de un algoritmo que le permite detectar en los videos a los sujetos experimentales, que han sido previamente delimitados con un área definida. El software reconoce cuando esta área (el organismo) se desplaza, y asigna valores de desplazamiento en función de la magnitud del movimiento (los valores son de distancia en m recorrida por el organismo). De esta manera los datos obtenidos indican el nivel de actividad (desplazamiento en metros) del organismo en cualquier momento.

Se configuró el programa para que exportara los datos de nivel de actividad con una frecuencia de 15 minutos. Estos datos fueron exportados como texto sencillo en formato ASCII, el cual puede leerse en el bloc de notas de Windows e importarse para su organización y manejo en hojas de cálculo de Microsoft Office Excel, 2013.

5.5.2. Obtención de actogramas a partir de los datos obtenidos en MATLAB

Los datos de nivel de actividad de cada organismo se organizaron en hojas de cálculo, y posteriormente fueron exportados con este nuevo formato para su procesamiento por medio del programa ImageJ ®. Se obtuvieron los actogramas con el programa anterior para la totalidad de los individuos experimentales, y con base en estos se realizó un actograma promedio por cada condición; estos se obtuvieron usando el complemento o *plugin* ActogramJ© (Schmid *et al.*, 2011), en ImageJ. Este complemento permite graficar en una misma ventana de trabajo todos los actogramas que se deseen y posteriormente seleccionar aquellos actogramas de interés y graficar un nuevo actograma promedio, con la opción “Calculate>Average” disponible en el menú “Analyze” de ImageJ. En este caso sólo se promediaron los actogramas que

presentaron periodo significativo. Con los actogramas obtenidos en este programa se determinaron los organismos que presentaron un periodo en su ciclo de actividad y si dicho periodo fue significativo ($p < 0.05$). Para cada condición experimental sólo se promediaron los actogramas que presentaron periodo significativo. Los periodos se estimaron usando los métodos de análisis de periodograma de Lomb-Scargle y Chi-cuadrado, ambos disponibles en este paquete informático, en la función "Periodogram". En el Anexo I se detalla el criterio para distinguir periodos significativos de periodos no significativos, siguiendo este método.

5.6. Caracterización del ritmo de actividad locomotora.

Uno de los principales objetivos de este trabajo es caracterizar el ritmo de actividad locomotora de los juveniles de *A. mexicanum*. El principal parámetro que caracteriza el ritmo es el periodo y a partir de este, se procedió a obtener una serie de parámetros que se presentan por primera vez para el ritmo de actividad de esta especie. Los parámetros fueron calculados solamente para aquellos organismos para los que el programa detectó un periodo significativo. De esta manera, el número de organismos con periodo significativo equivale al tamaño de la muestra poblacional (n) utilizado para obtener los demás parámetros, y a su vez es la n utilizada en las pruebas estadísticas.

Acrofase: se estimó directamente en ImageJ, usando la función "Acrophase". El programa señala en el actograma la posición de la acrofase en cada uno de los días seleccionados, y este dato puede consultarse usando la función "Edit marker". El dato que se consideró para cada organismo fue el promedio de los valores diarios que se obtuvieron con esta función. Cada dato se expresa en horas de tiempo zeitgeber (ZT) para los días en LO y en horas de tiempo circadiano (CT) para los días en OO. Cabe recordar que la hora ZT 0 está dada por el inicio de las horas de luz (encendido de la luz), que en CT 0 sería el inicio del día subjetivo.

Inicio de actividad: se estimó directamente en ImageJ, usando la función "Activity on-and offset". Al usar esta función, el inicio y el fin de la actividad quedan señalados en cada uno de los días seleccionados, y los datos pueden consultarse usando la función "Edit marker". El dato que se consideró para cada organismo fue el promedio de los valores diarios que se obtuvieron con esta función. Al igual que se hizo con la acrofase, los datos se expresaron en ZT y CT.

Actividad promedio: se obtuvo a partir de un gráfico generado en ImageJ usando la función "Average activity". Este gráfico representa el promedio de los niveles de actividad diarios, a lo largo del periodo del ritmo. A partir de este gráfico se exporta un archivo con los valores de nivel de actividad, en formato de hoja de cálculo. El promedio de dichos valores es el que se considera como dato final para cada organismo.

Amplitud: se obtuvo a partir de los valores obtenidos del gráfico de actividad promedio, restando el valor mínimo del valor máximo.

Horas de actividad (α): se obtuvo restando la hora de inicio de actividad a la hora de fin de actividad, ambos obtenidos previamente en ImageJ. Fue considerado como dato final el promedio de los valores diarios en el actograma.

Horas de reposo (ρ): se obtuvo restando al periodo las horas de actividad (α).

Relación α/ρ : se obtuvo dividiendo las horas de actividad (α) entre las horas de reposo (ρ).

Estos parámetros se obtuvieron para cada individuo que presentó periodo significativo como se señaló previamente; sin embargo, en la sección de resultados se muestran solamente los promedios de dichos datos individuales para cada condición experimental.

5.7. Análisis estadístico

Se llevaron a cabo diferentes pruebas estadísticas para responder a los objetivos particulares de este trabajo:

- Análisis de comparación múltiple entre condiciones experimentales. Se realizó para evaluar el efecto de las variables intensidad lumínica y patrón alimentario en el ritmo de actividad locomotora. Las comparaciones se hicieron para cada parámetro del ritmo de los organismos de cada condición experimental, mediante el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis (STATISTICA ver. 10, StatSoft Inc, 2011). Se efectuaron análisis independientes para LO y para OO.
- Análisis pareado dentro de la misma condición experimental (LO contra OO). Se realizó para evaluar si la intensidad de luz y el patrón alimentario actuaron como estímulos sincronizantes. Este análisis se ejecutó comparando cada parámetro del ritmo de los organismos de una misma condición experimental entre LO y OO, mediante el análisis no paramétrico de datos pareados de Wilcoxon (*Wilcoxon Matched Pairs Test*) (STATISTICA ver. 10, StatSoft Inc, 2011).
- Análisis entre dos condiciones experimentales (A-S contra B-S) y un mismo fotoperiodo (LO). Se realizó para evaluar el efecto de la intensidad de la luz (alta y baja) en parámetros del ritmo de organismos con alimentación sincrónica (S) en LO, mediante el análisis no paramétrico de Mann-Whitney (*Mann-Whitney U Test*; STATISTICA ver. 10, StatSoft Inc, 2011).

Los resultados de estos análisis estadísticos se presentan en el Anexo II.

De manera adicional y para visualizar la dispersión de cada parámetro del ritmo, se realizaron diagramas de cajas en paralelo en torno a la mediana (STATISTICA ver. 10, StatSoft Inc, 2011).

6. RESULTADOS

6.1 Mediciones morfométricas de los organismos de estudio

Los valores de peso húmedo, longitud patrón y longitud total de los 12 organismos procedentes de cada condición experimental (Tabla 2) denotan que no hubo diferencias significativas en estas variables y por lo tanto se considera que no fueron factores causales de las diferencias significativas observadas en los parámetros de los ritmos obtenidos.

Tabla 2. Relación de pesos y medidas morfométricas de los organismos experimentales al inicio de los registros. Se señalan valores promedio y de error estándar. No hay diferencias significativas en las variables registradas de los organismos procedentes de las diferentes condiciones experimentales.

Condición experimental	Peso (g PH)	Longitud patrón (mm)	Longitud total (mm)
A-S. Intensidad lumínica alta y alimentación sincrónica	17.23 ± 0.55	62.04 ± 0.98	121.33 ± 0.93
A-As. Intensidad lumínica alta y alimentación asincrónica	18.74 ± 0.64	61.83 ± 1.16	122.5 ± 1.69
B-S. Intensidad lumínica baja y alimentación sincrónica	18.66 ± 1.14	62.5 ± 1.33	123.5 ± 2.46
B-As. Intensidad lumínica baja y alimentación asincrónica	17.31 ± 0.55	64.0 ± 0.78	122.67 ± 1.39

No hay diferencias significativas en las variables registradas de los organismos procedentes de las diferentes condiciones experimentales. PH (peso húmedo).

6.2 Parámetros fisicoquímicos

El comportamiento de los parámetros fisicoquímicos evaluados a lo largo del periodo de registro de 14 d para las cuatro condiciones experimentales (Tabla 3), muestra que la temperatura, el oxígeno disuelto y los niveles de amonio se mantuvieron constantes ($p > 0.05$); particularmente el amonio se mantuvo en niveles inferiores a 0.1 mg/L. El único parámetro en el que se detectaron diferencias significativas entre condiciones experimentales fue el pH ($p < 0.05$), parámetro que tendió a disminuir en las primeras dos condiciones experimentales (intensidad lumínica alta), siendo más notoria esta reducción en la condición A-As. En las condiciones experimentales de B-S y B-As se utilizó esqueleto de coral en el compartimento reservorio de los sistemas de registro para amortiguar los cambios en el pH y mantenerlos en condiciones ligeramente básicas. Dado el comportamiento de los parámetros fisicoquímicos evaluados, se considera que no ejercieron efecto en los resultados obtenidos en los experimentos.

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos evaluados a lo largo del periodo de registro, de 12 d. Se señalan valores promedio y de error estándar.

Condición experimental	Temperatura (°C)	pH	Oxígeno disuelto (mg O ₂ /L)	Amonio Total (mg N-NH ₄ ⁺ /L)
A-S. Intensidad lumínica alta y alimentación sincrónica	18.8 ± 0.1	6.95 ± 0.05 ^{ab}	6.32 ± 0.03	0.06 ± 0.01
A-As. Intensidad lumínica alta y alimentación asincrónica	18.8 ± 0.15	6.57 ± 0.08 ^a	6.37 ± 0.03	0.07 ± 0.01
B-S. Intensidad lumínica baja y alimentación sincrónica	18.95 ± 0.26	7.31 ± 0.06 ^{bc}	6.35 ± 0.02	0.03 ± 0.02
B-As. Intensidad lumínica baja y alimentación asincrónica	19.13 ± 0.19	7.4 ± 0.04 ^c	6.33 ± 0.02	0.02 ± 0.009

En la columna de pH, letras diferentes en superíndice denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

6.3 Actogramas

Los actogramas promedio de los organismos de las diferentes condiciones experimentales que presentaron un periodo significativo (ritmo; $p < 0.05$) aportaron una visión integradora de su comportamiento locomotor temporal, a lo largo de los registros de 6 d en LO y 4 d en OO (Fig. 6). El número de individuos con ritmo significativo (n) fue similar para las condiciones experimentales A-S, A-As y B-S, tanto en LO como en OO. En LO, el 100% de los organismos tuvieron un ritmo significativo ($p < 0.05$) mientras que en OO el ritmo significativo ($p < 0.05$) se detectó en el 58 al 67% de los organismos. En contraste, en la condición B-As el 67% de los organismos expresaron un ritmo significativo en LO y sólo el 25% durante OO (Tabla 4).

De manera general, la actividad promedio de los organismos que presentaron periodo significativo fue claramente de tipo diurno en los 6 primeros días de registro en LO, actividad que se atenuó en los cuatro días posteriores de registro en oscuridad constante (OO) (Fig. 6). En las condiciones A-S (Fig. 6A) y B-S (Fig. 6C) la actividad de los organismos en LO inició muy cerca de la hora de encendido de la luz, con una mayor actividad cerca de la hora de alimentación. No obstante, la actividad de los organismos en la condición B-S fue menor tanto en LO como en OO, respecto a los organismos en la condición A-S.

En los organismos de las condiciones A-As (Fig. 6B) y B-As (Fig. 6D) el inicio de la actividad locomotora en LO no se relacionó claramente con el encendido de la luz. En la condición A-As, la mayor actividad no se relacionó con el periodo de alimentación, a diferencia de los organismos de la condición B-As cuyo actograma sugiere la mayor actividad relacionada con el periodo de suministro del alimento. No obstante en OO, el inicio de la actividad locomotora y el registro de la mayor actividad no se relacionaron claramente ni con el encendido de luz ni con el periodo de alimentación.

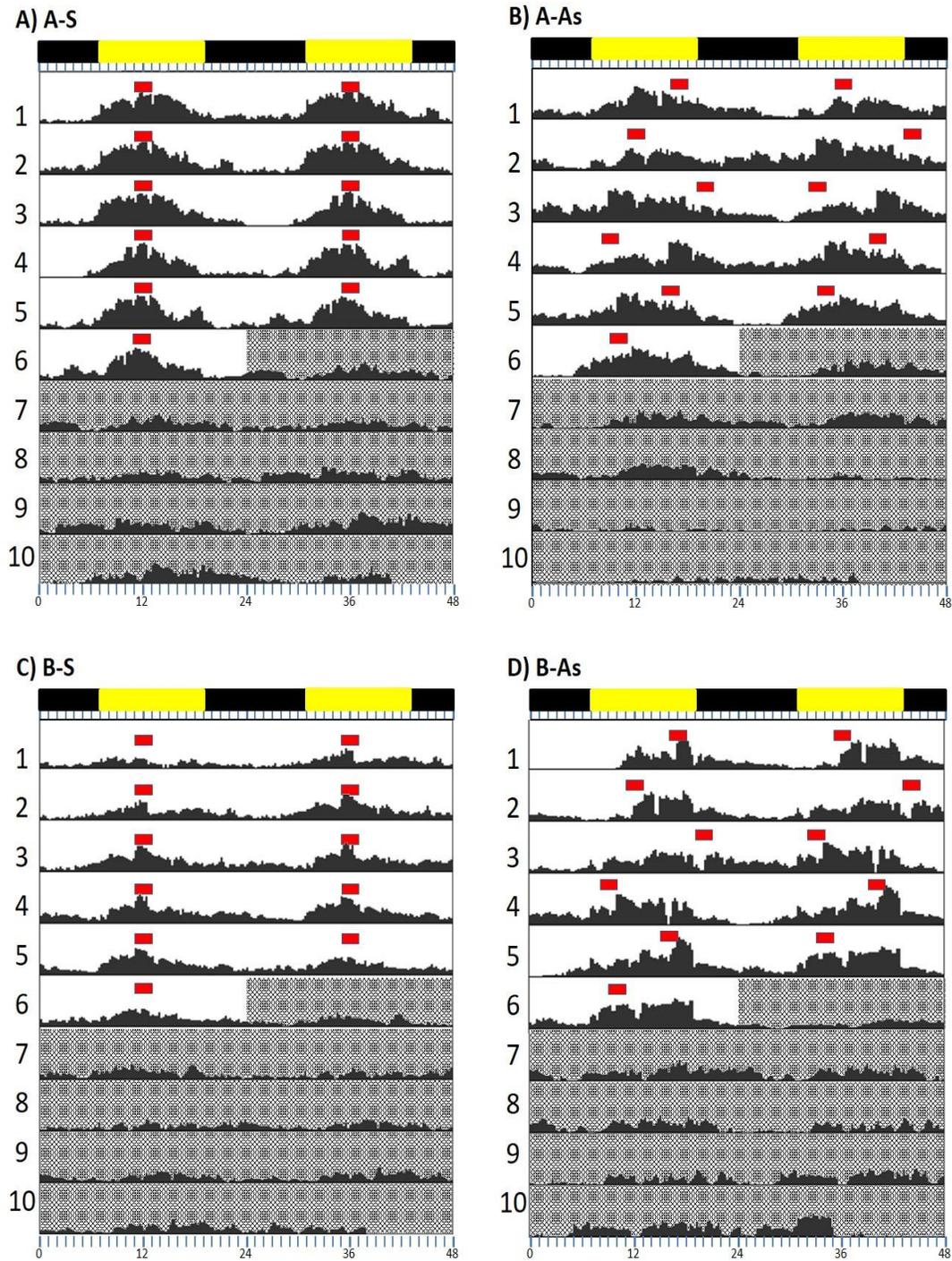


Figura 6. Actograma promedio de los ajolotes de cada condición experimental, en LO y OO A) A-S: Intensidad lumínica alta (650 luxes) y alimentación sincrónica; B) A-As: Intensidad lumínica alta y alimentación asincrónica; C) B-S: Intensidad lumínica baja (130 luxes) y alimentación sincrónica; D) B-As: Intensidad lumínica baja y alimentación asincrónica. Por actograma, en cada renglón se visualizan 48 h de actividad (los días están doblemente graficados). Los números a la izquierda indican los días de registro y los renglones sombreados corresponden a OO. La barra superior indica las horas de fotofase en amarillo y las horas de escotofase en negro. Las barras rojas al interior de los actogramas indican las horas de alimentación (2 h).

6.4 Caracterización de ritmos de actividad locomotora y efectos de la intensidad lumínica y el patrón alimentario.

A partir de los actogramas promedio de los organismos que presentaron periodo significativo, se obtuvieron los parámetros que caracterizaron el ritmo y su comportamiento en las diferentes condiciones experimentales (Tabla 4; Fig 7 a 10). De manera general y en todas las condiciones experimentales, los resultados denotaron el patrón diurno de la actividad locomotora de los ajolotes en LO y su mantenimiento en el día subjetivo en OO, si bien la dispersión de los parámetros evaluados fue mayor en OO que en LO (error estándar de los parámetros mayor en OO que en LO). En las cuatro condiciones experimentales se registraron ritmos (periodos) significativos en LO y OO cercanos a las 24 h ($p < 0.05$), con el inicio de la actividad diurna y acrofases definidas. No obstante, se observó la atenuación de la actividad locomotora ($p < 0.05$) en OO y estas fases fueron menos conspicuas que en LO particularmente en las condiciones de luz baja B-S y B-As (Tabla 4, Fig. 9 y 10).

En los organismos de la condición A-S, el inicio de actividad en LO se registró 0.27 h antes del encendido de la luz (ZT -0.27) y la mayor actividad (acrofase) se registró 1.21 h después de la hora de suministro del alimento (ZT 5.21) (Tabla 4, Fig. 7A). En OO, se registró una ligera anticipación en el inicio de la actividad (CT -0.98) y en el registro de la acrofase (CT 4.63) en relación a lo observado en LO (Tabla 4, Fig. 7B). Conforme a lo esperado, la amplitud de la actividad locomotora de los organismos en LO (0.43 m) fue mayor ($p < 0.05$) que la registrada en OO (0.26 m) (Tabla 4).

De manera similar a lo obtenido en la condición A-S, el inicio de actividad de los organismos de la condición B-S durante LO se registró a las 0.29 h antes del encendido de la luz (ZT -0.29) con una mayor actividad 1.42 h después de la hora de alimentación (ZT 5.42) (Tabla 4, Fig. 8A). Sin embargo, en los días en libre curso (OO) se observó un cambio de fase cercano a las 2 h en el inicio de la actividad (CT 1.87) y en la acrofase (CT 7.65) en relación a LO (Tabla 4, Fig. 8B). La amplitud de la actividad locomotora en LO (0.39 m) fue mayor ($p < 0.05$) que la registrada en OO (0.19). En ambos casos, la amplitud de la actividad locomotora en B-S durante LO y OO fue menor ($p < 0.05$) que las registradas en la condición A-S (Tabla 4).

Los resultados obtenidos en las condiciones de alimentación sincrónica (A-S y B-S) denotan que el inicio de la actividad en LO se relaciona con el encendido de la luz y la acrofase ocurre después del suministro del alimento. De tal manera, estos resultados sugieren la participación del estímulo lumínico y la alimentación (sincrónica y restringida a 2 h) en la sincronización de la ritmicidad circadiana de la actividad locomotora de los ajolotes. De igual manera, los resultados sugieren que en condiciones de alimentación sincrónica la intensidad de la luz influye sobre la expresión de la actividad locomotora de los ajolotes ya que en condiciones de alta intensidad (650 luxes; condición B) la actividad es mayor ($p < 0.05$) que en condiciones de baja intensidad (130 luxes).

Tabla 4. Parámetros del ritmo de la actividad locomotora en LO y OO de *A. mexicanum* en las diferentes condiciones experimentales. Se señalan los valores promedio y error estándar de cada parámetro. Se incluye el número de organismos (*n*) que presentaron un periodo significativo en LO y OO.

Parámetro		Condiciones Experimentales							
		A-S		A-As		B-S		B-As	
		Media	E. E.	Media	E. E.	Media	E. E.	Media	E. E.
Periodo (h)	LO	23.96	0.04	23.63	0.10	24.02	0.10	23.84	0.10
	OO	24.84	0.65	24.50	0.79	23.78	0.37	23.83	0.79
Amplitud (metros)	LO	0.43^a	0.01	0.34^b	0.02	0.32^{cb}	0.03	0.36^{ab}	0.02
	OO	0.26[*]	0.03	0.20[*]	0.05	0.19[*]	0.04	0.20[*]	0.07
Actividad media (metros)	LO	0.17	0.01	0.16	0.02	0.11	0.01	0.16	0.02
	OO	0.10[*]	0.02	0.07[*]	0.02	0.07	0.02	0.08[*]	0.04
Acrofase (h ZT ó CT)	LO	5.21^a	0.17	7.87^b	0.44	5.42^a	0.48	8.16^b	0.59
	OO	4.63^{ab}	1.94	6.63^b	0.96	7.65^{cb}	1.05	9.55^c	0.20
Inicio de activ. (h ZT ó CT)	LO	-0.27^a	0.24	2.34^b	0.37	-0.29^a	0.48	2.45^b	0.67
	OO	-0.98^{ab}	1.85	-0.99^b	0.99	1.87^{cb}	0.97	3.77^c	0.63
Dif. acrofase-alim (h)	LO	1.21	0.17	n/a	n/a	1.42	0.48	n/a	n/a
	OO	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Dif. alim-inic act (h)	LO	4.27	0.24	n/a	n/a	4.29	0.48	n/a	n/a
	OO	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Actividad α (h)	LO	11.45	0.11	11.10	0.23	11.49	0.47	11.13	0.21
	OO	10.35	0.36	11.04	0.67	10.89	0.35	10.84	0.85
Reposo ρ (h)	LO	12.51	0.11	12.49	0.30	12.48	0.47	12.71	0.20
	OO	14.50[*]	0.57	13.46	1.21	12.89	0.50	12.99	1.61
α/ρ	LO	0.92	0.02	0.90	0.04	0.95	0.09	0.88	0.03
	OO	0.72[*]	0.04	0.86	0.10	0.86	0.06	0.88	0.19
<i>n</i>	LO	12		12		12		8	
	OO	8		7		8		3	

Los dos parámetros de diferencia (Dif. “acrofase-alim” y “Dif. alim. inic act”) se obtuvieron únicamente para los ajolotes evaluados bajo alimentación sincrónica (A-S y B-S) en LO, por lo que en el resto de los casos estos parámetros no aplican (n/a). Para cada parámetro, letras superíndices diferentes denotan diferencias significativas entre condiciones experimentales ($P < 0.05$). Los asteriscos (*) en las casillas de OO denotan diferencias significativas de los valores de OO respecto a LO ($P < 0.05$).

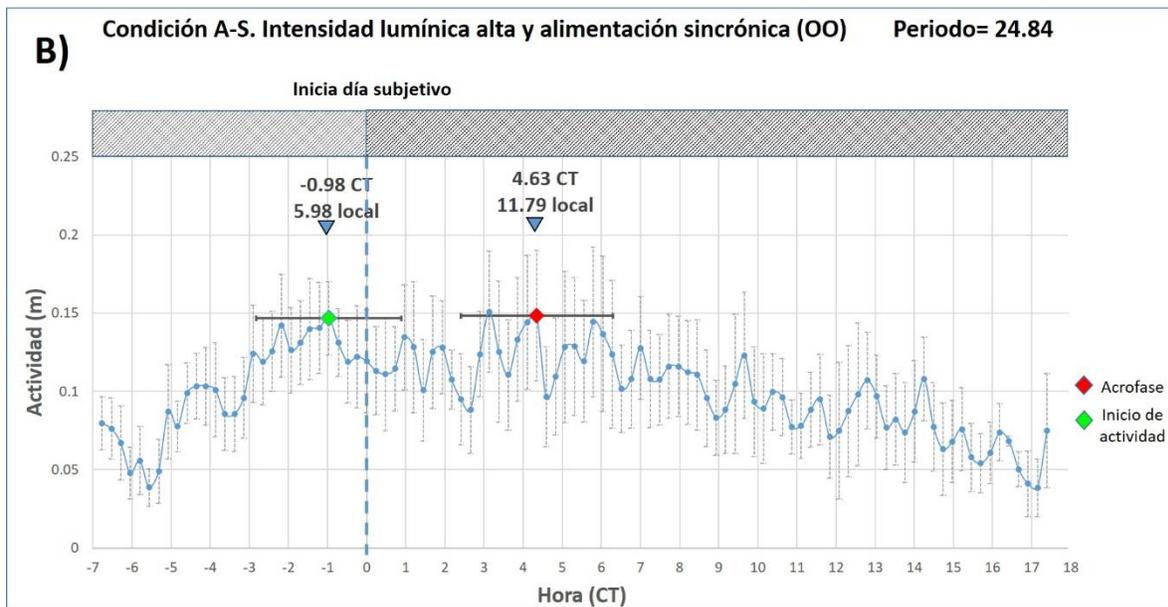
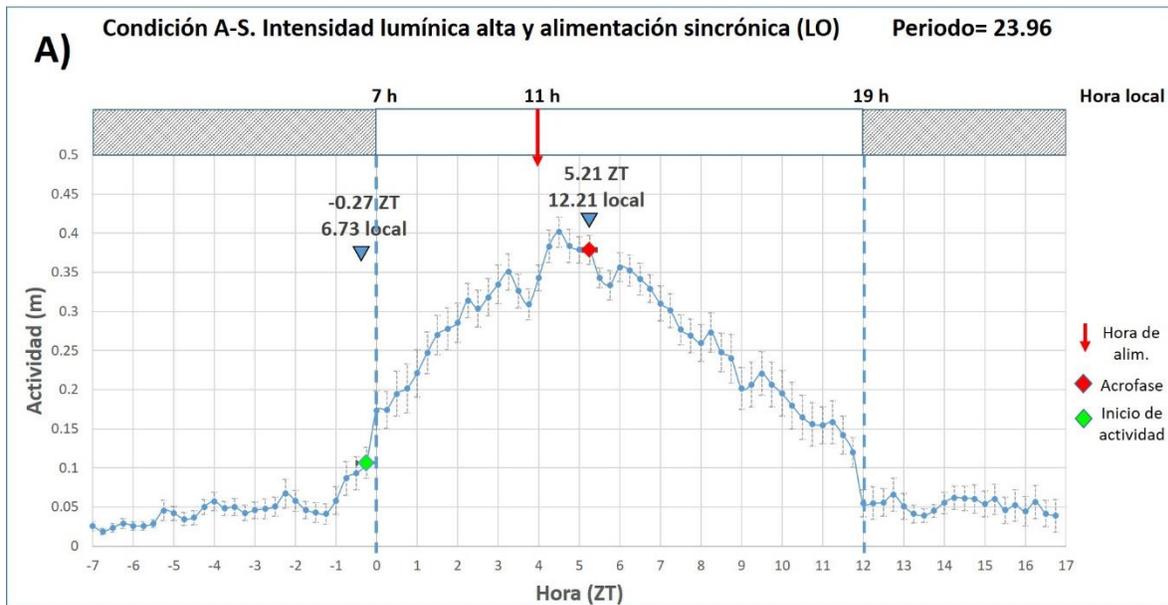


Figura 7. Actividad locomotora (m) de *A. mexicanum* a lo largo del periodo, en la condición experimental A-S. Se señalan valores promedio y error estándar; las barras horizontales denotan el valor promedio y de error estándar de la hora de las fases. A) LO, $n=12$; B) OO, $n=8$. El tiempo (eje x) se muestra en hora local (barra superior indicando fotoperiodo) y en horas ZT (LO) y CT (OO).

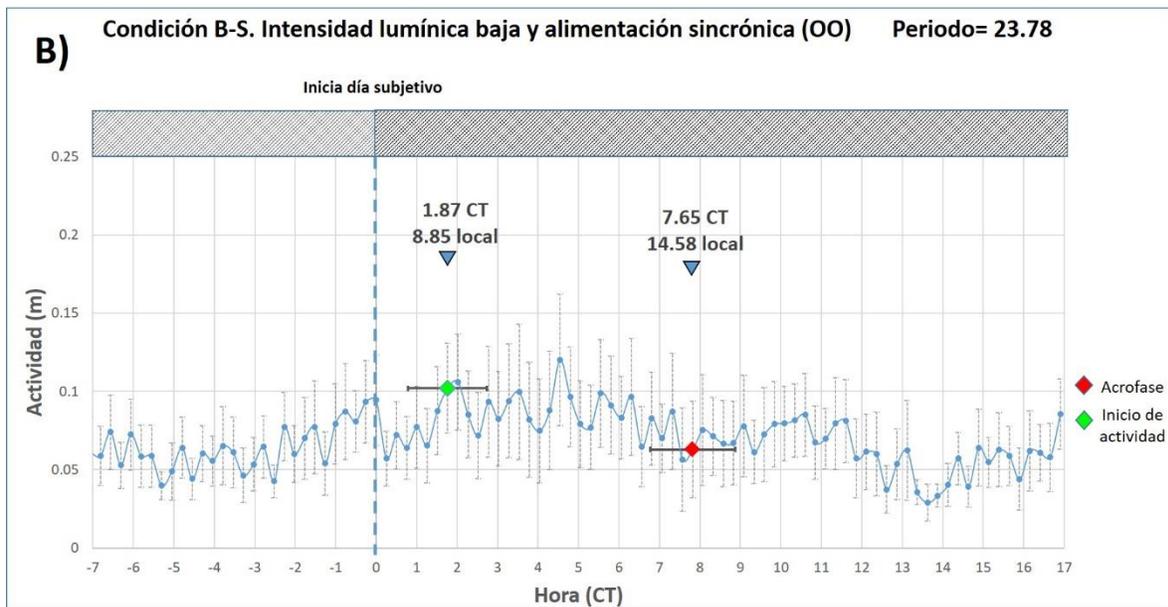
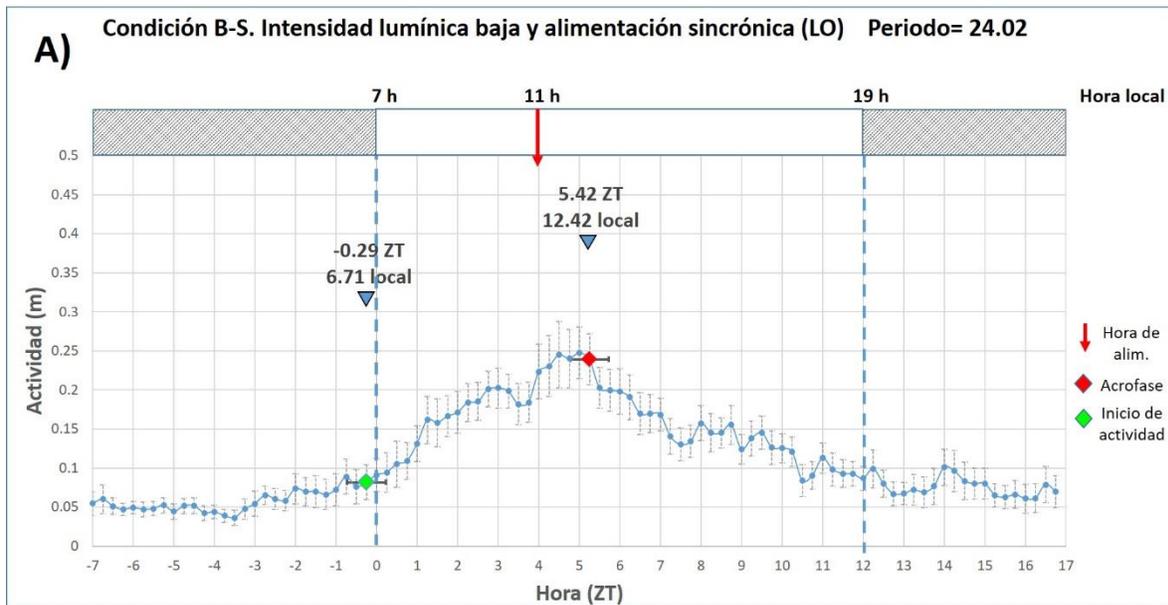


Figura 8. Actividad locomotora (m) de *A. mexicanum* a lo largo del periodo, en la condición experimental B-S. Se señalan valores promedio y error estándar; las barras horizontales denotan el valor promedio y de error estándar de la hora de las fases. A) LO, $n=12$; B) OO, $n=8$. El tiempo (eje x) se muestra en hora local (barra superior indicando fotoperiodo) y en horas ZT (LO) y CT (OO).

A diferencia de lo observado en los organismos con alimentación sincrónica (S), el inicio de la actividad durante LO en los ajolotes con alimentación asincrónica (As) no se relacionó con el prendido de la luz y tanto en condiciones de intensidad lumínica alta como baja (A-As y B-As) se registró posterior a las 2.3 h del encendido de la luz (ZT 2.34 y 2.45, respectivamente). Tanto en A-As y B-As, las acrofases se registraron cercanas a las 8 h del prendido de la luz (ZT 7.87 y 8.16, respectivamente) sin ninguna relación con el estímulo de alimentación dado el patrón asincrónico, aleatorio del suministro del alimento (Tabla 4, Fig. 9A y 10A). A diferencia de lo observado en la condición A-As, el registro diurno de la mayor actividad de los organismos de la condición B-As (acrofase) pareciera relacionarse con el suministro asincrónico del alimento (Fig. 6D). La amplitud de la actividad de los organismos en A-As y B-As fue similar ($p > 0.05$) e independiente de la intensidad lumínica tanto en LO como en OO. Al igual que en la condición de alimentación sincrónica, la amplitud de la actividad de los organismos en la condición B-As fue mayor ($p > 0.05$) en LO que en OO. Cabe señalar que los valores de este parámetro en LO y OO fueron similares ($p > 0.05$) a lo registrado en la condición B-S (Tabla 4).

A diferencia de lo observado en la condición A-As durante LO, el inicio de la actividad de los ajolotes en los días en libre curso (OO) se registró 0.99 h antes del prendido de la luz (CT -0.99) si bien el registro de la acrofase fue similar al observado en LO, 6.63 h posterior al prendido de la luz (CT 6.63). En B-As y al igual que lo observado en LO, el inicio de la actividad durante OO no se relacionó con el prendido de la luz y se registró 3.77 h posterior a su encendido (CT 3.77); en OO la acrofase se registró a las 9.55 h del encendido de la luz (CT 9.55) (Tabla 4, Fig. 9B y 10B).

En los ajolotes con alimentación asincrónica, tanto en alta como en baja intensidad lumínica (A-As y B-As), es de notar que el inicio de la actividad en LO no se relacionó con el encendido de la luz, resultados que sugieren la influencia de la alimentación en este cambio de fase. Por otro lado, los resultados sugieren que en condiciones de alimentación asincrónica la intensidad de la luz no influye la magnitud de la actividad locomotora de los ajolotes ya que las amplitudes fueron similares ($p > 0.05$) tanto en alta (650 luxes; condición A) como en baja (130 luxes; condición B) intensidad lumínica.

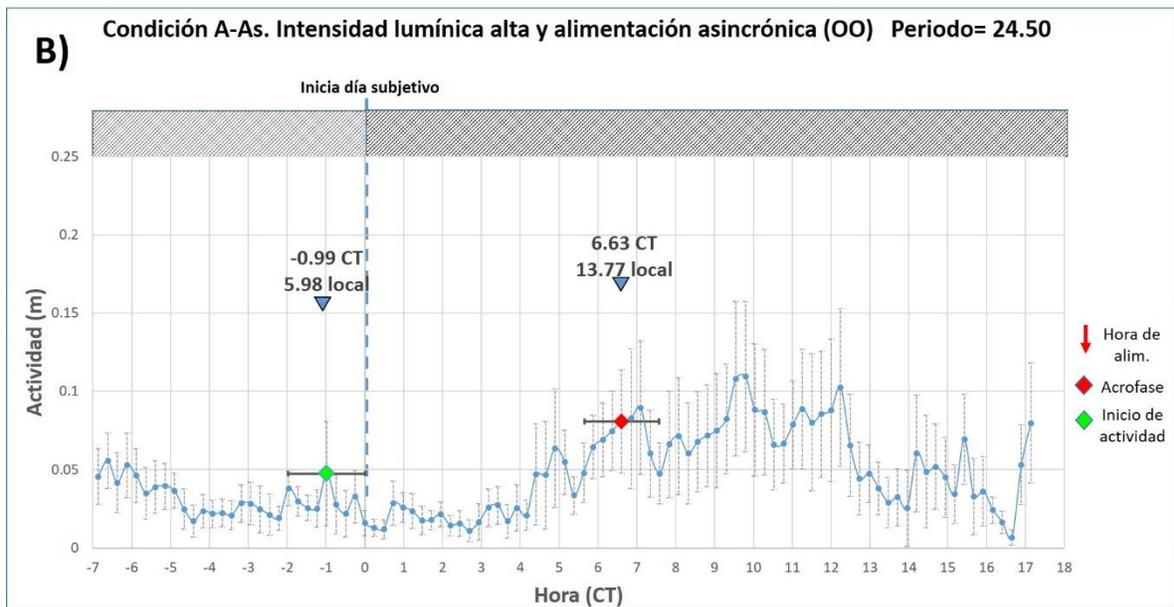
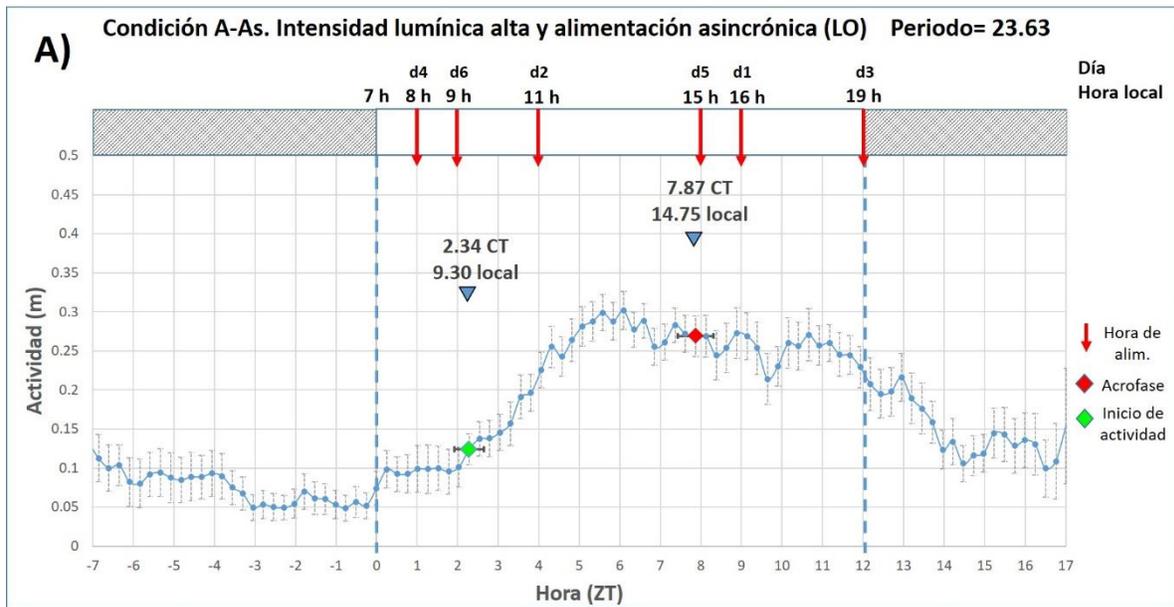


Figura 9. Actividad locomotora (m) de *A. mexicanum* a lo largo del periodo, en la condición experimental A-As. Se señalan valores promedio y error estándar; las barras horizontales denotan el valor promedio y de error estándar de la hora de las fases. A) LO, $n=12$; B) OO, $n=7$. El tiempo (eje x) se muestra en hora local (barra superior indicando fotoperiodo) y en horas ZT (LO) y CT (OO).

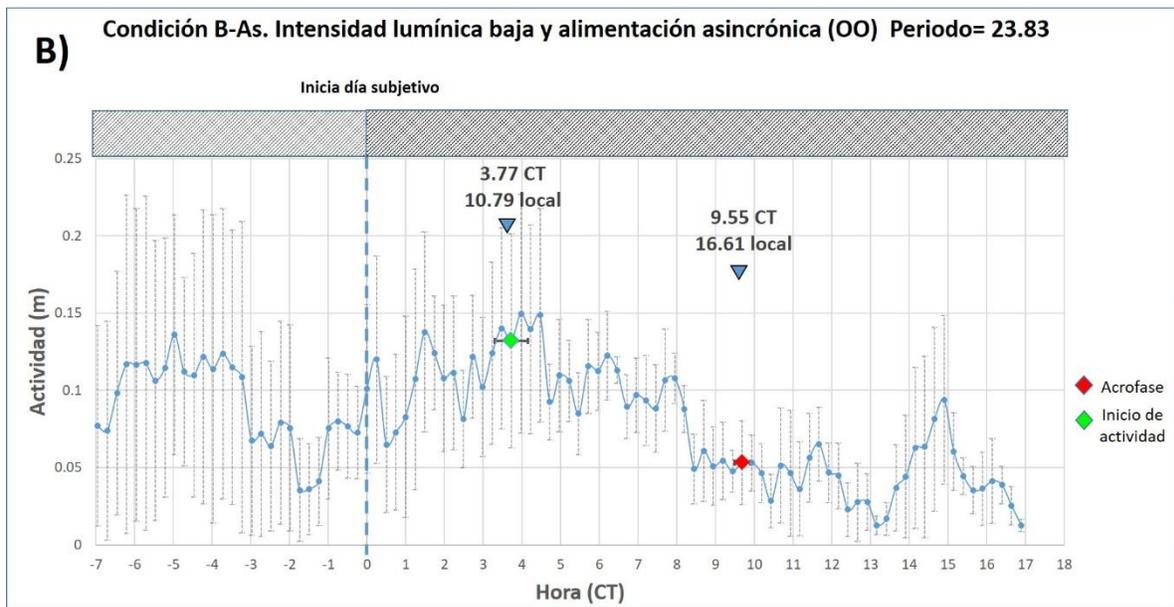
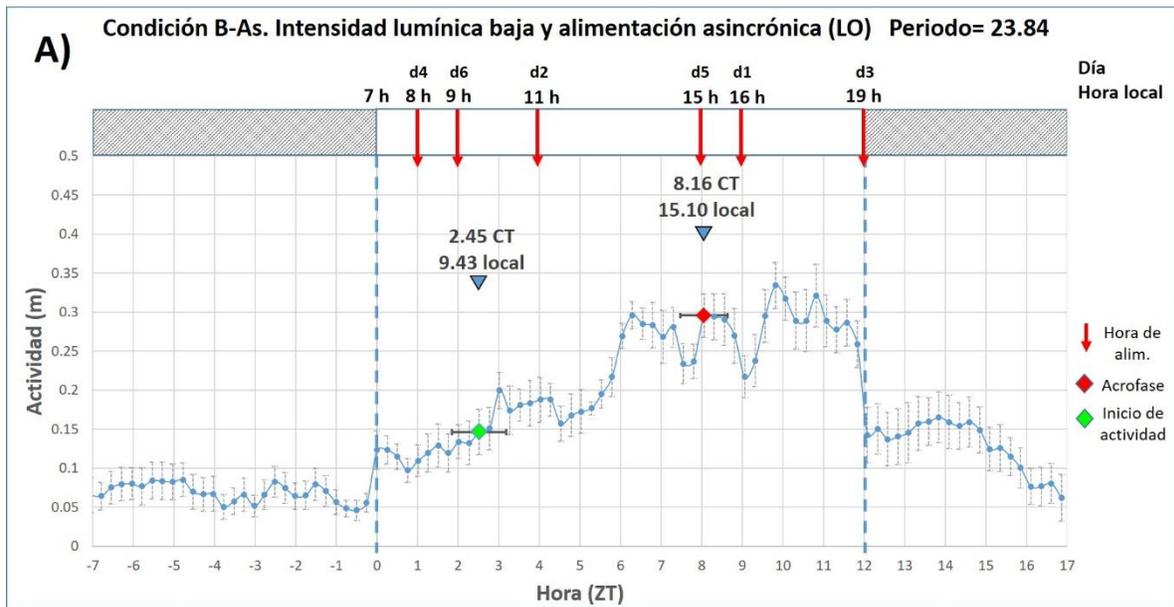


Figura 10. Actividad locomotora (m) de *A. mexicanum* a lo largo del periodo, en la condición experimental B-As. Se señalan valores promedio y error estándar; las barras horizontales denotan el valor promedio y de error estándar de la hora de las fases. A) LO, $n= 8$; B) OO, $n=3$. El tiempo (eje x) se muestra en hora local (barra superior indicando fotoperiodo) y en horas ZT (LO) y CT (OO).

6.5 Efecto de la luz y el patrón de alimentación en los parámetros de los ritmos

El comportamiento de los parámetros que caracterizan el ritmo de la actividad locomotora de los ajolotes bajo los estímulos de luz (alta y baja; A y B) y alimentación (sincrónica y asincrónica; S y As) se visualizan en las figuras 11 a 18. En todas las condiciones experimentales, los organismos que exhibieron una ritmicidad significativa ($p < 0.05$) presentaron valores similares del **periodo** ($p > 0.05$) cercanos a las 24 h. Esto es, el periodo de la actividad locomotora de los ajolotes fue similar ($p > 0.05$) independientemente de la intensidad lumínica y del patrón de alimentación, en LO y OO. No obstante, es evidente la mayor dispersión de los valores del parámetro en los organismos en OO (Fig. 11) (Tabla 4).

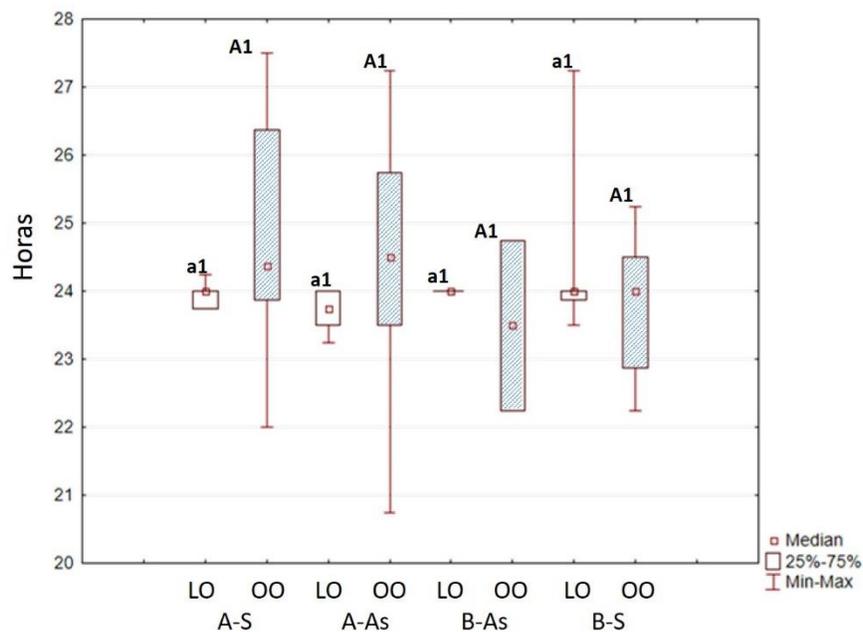


Figura 11. Diagrama de cajas en paralelo del periodo (h) de la actividad locomotora de *A. mexicanum* en las condiciones experimentales de alimentación sincrónica (S) y asincrónica (As) e intensidad lumínica alta (A) y baja (B) en LO (cajas claras) y OO (cajas sombreadas). Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas en LO ($p < 0.05$) entre experimentos. Letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas en OO ($p < 0.05$) entre experimentos. Números diferentes denotan diferencias significativas entre LO y OO ($p < 0.05$) de cada experimento.

La **amplitud** de la actividad locomotora de los ajolotes de todas las condiciones experimentales fue mayor en LO que en OO ($p < 0.05$); además, la actividad de los organismos se atenuó significativamente ($p < 0.05$) en los días en libre curso (OO) (Fig. 12). En LO, los organismos con alimentación sincrónica y alta intensidad lumínica (A-S) registraron una mayor amplitud ($p < 0.05$) que los organismos de las condiciones A-As y B-S, pero fue similar ($p > 0.05$) a la de los ajolotes de la condición B-As. No se observaron diferencias significativas en la amplitud registrada en los grupos A-As, B-As y B-S ($p > 0.05$). Por otro lado, la amplitud en OO fue similar ($p > 0.05$) e independiente del patrón alimentario y la intensidad lumínica. Los resultados obtenidos en LO denotan que la combinación de luz alta y alimentación sincrónica (A-S) influye en la amplitud de la actividad locomotora incrementándola significativamente ($p < 0.05$).

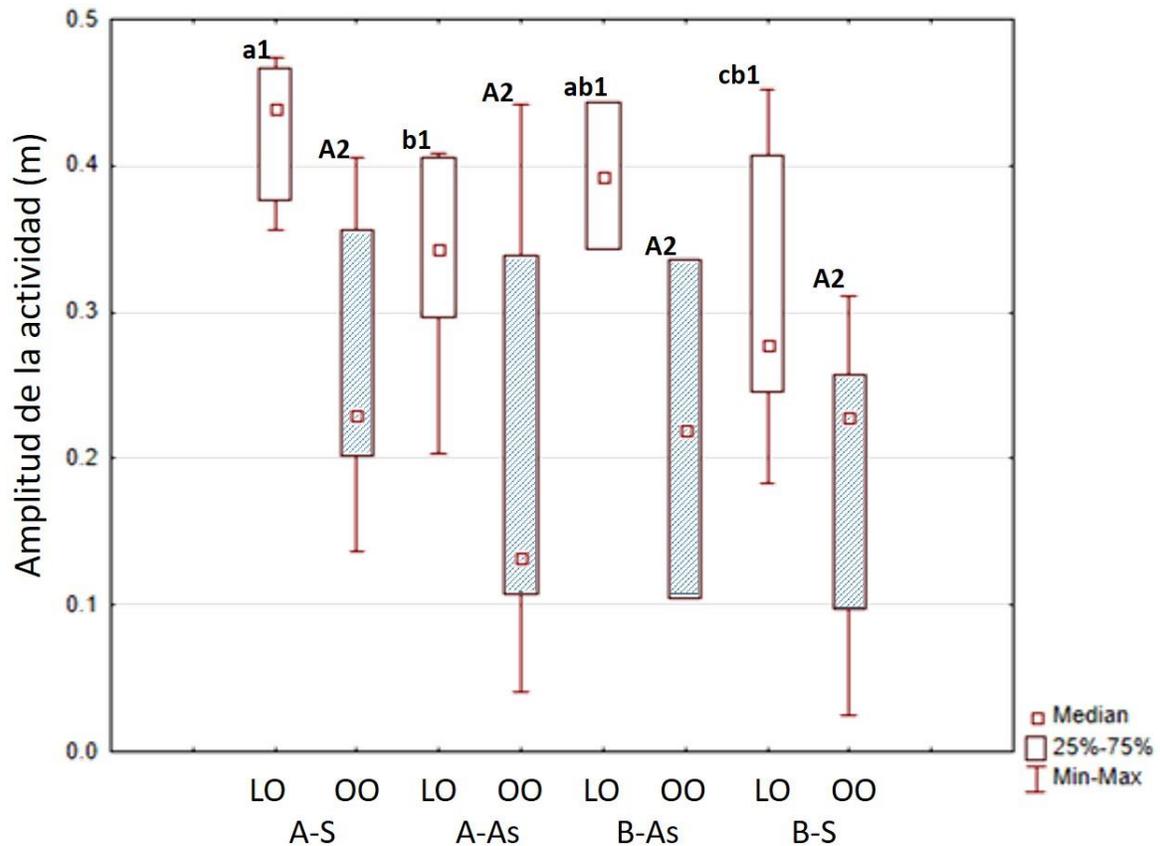


Figura 12. Diagrama de cajas en paralelo de la amplitud (m) de la actividad locomotora de *A. mexicanum* en las condiciones experimentales de alimentación sincrónica (S) y asincrónica (As) e intensidad lumínica alta (A) y baja (B) en LO (cajas claras) y OO (cajas sombreadas). Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas en LO ($p < 0.05$) entre experimentos. Letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas en OO ($p < 0.05$) entre experimentos. Números diferentes denotan diferencias significativas entre LO y OO ($p < 0.05$) de cada experimento.

La actividad promedio (m) de los organismos de todas las condiciones experimentales fue mayor en LO que en OO ($p < 0.05$), a excepción de los organismos de la condición B-As, donde la actividad promedio fue similar en LO y OO ($p > 0.05$) (Fig. 13). Esto es, a excepción de la condición B-As, en las condiciones A-S, A-As y B-S la actividad promedio (m) de los organismos presentó atenuación al pasar de LO a OO. No obstante los niveles de actividad tanto en LO como en OO fueron similares e independiente de la intensidad lumínica y el patrón alimentario ($p > 0.05$).

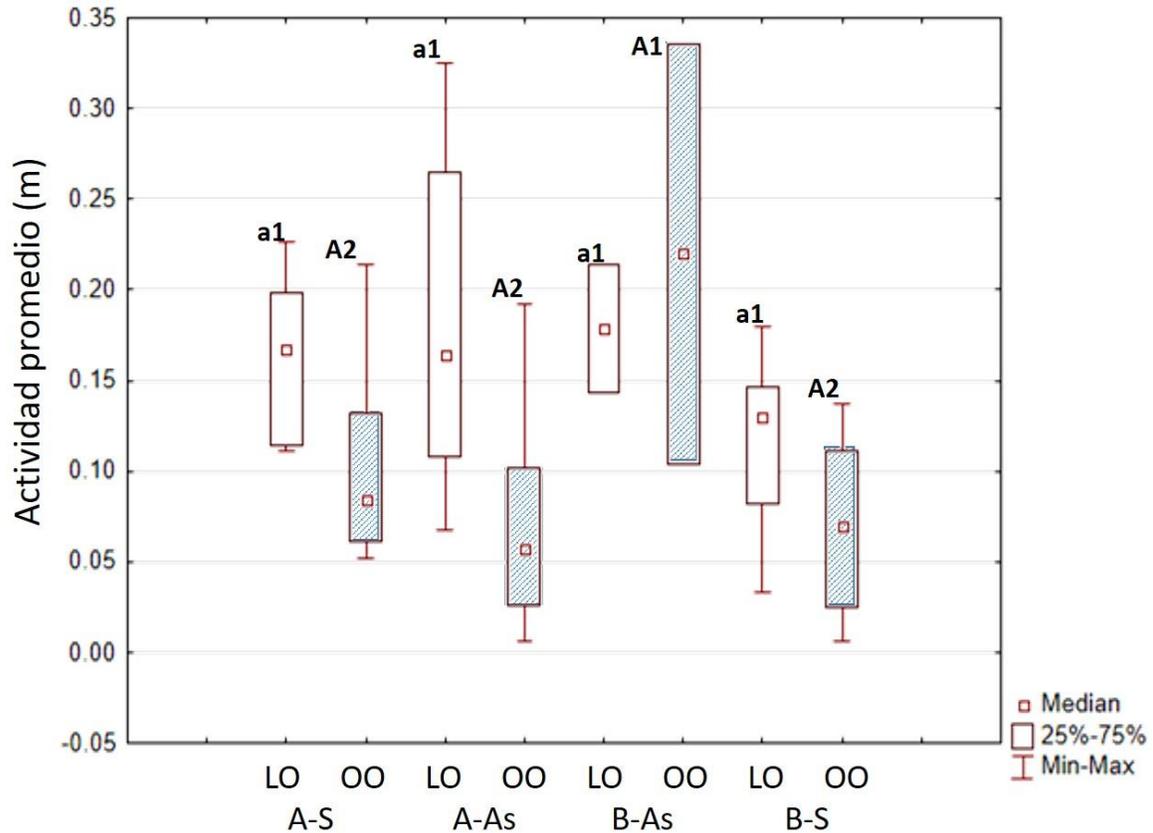


Figura 13. Diagrama de cajas en paralelo de la actividad promedio (m) de la actividad locomotora de *A. mexicanum* en las condiciones experimentales de alimentación sincrónica (S) y asincrónica (As) e intensidad lumínica alta (A) y baja (B) en LO (cajas claras) y OO (cajas sombreadas). Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas en LO ($p < 0.05$) entre experimentos. Letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas en OO ($p < 0.05$) entre experimentos. Números diferentes denotan diferencias significativas entre LO y OO ($p < 0.05$) de cada experimento.

El **inicio de la actividad locomotora** de los ajolotes en LO de las condiciones A-S y B-S fue similar ($p > 0.05$) y cercano al encendido la luz (ZT -0.27 y -0.29, respectivamente); esto es, el inicio de la actividad en los organismos con alimentación sincrónica se registró a la misma hora y antecedió cerca de 0.3 h al encendido de la luz, independiente de la intensidad lumínica (Fig. 14). En los organismos con alimentación asincrónica, el inicio de actividad en LO fue similar ($p > 0.05$) en las condiciones A-As y B-As (ZT 2.34 y 2.45, respectivamente) y se registró cerca de 2.3 h posteriores al encendido de la luz. Así, el inicio de actividad en los ajolotes con alimentación asincrónica no se relacionó con el encendido de la luz y registró una diferencia en la fase de cerca de 2.3 h con respecto a los ajolotes con alimentación sincrónica (A-S y B-S) ($p < 0.05$). En los organismos en libre curso (OO), el inicio de la actividad en A-S fue similar a A-As (CT -0.98 y -0.99, respectivamente) y antecedió por cerca de 1 h al prendido de la luz. En contraste, el inicio de la actividad en B-S y B-As se registró posterior al encendido de la luz (CT 1.87 y 3.77, respectivamente). No obstante, en cada grupo experimental no se registraron diferencias significativas en el inicio de actividad entre LO y OO ($p < 0.05$).

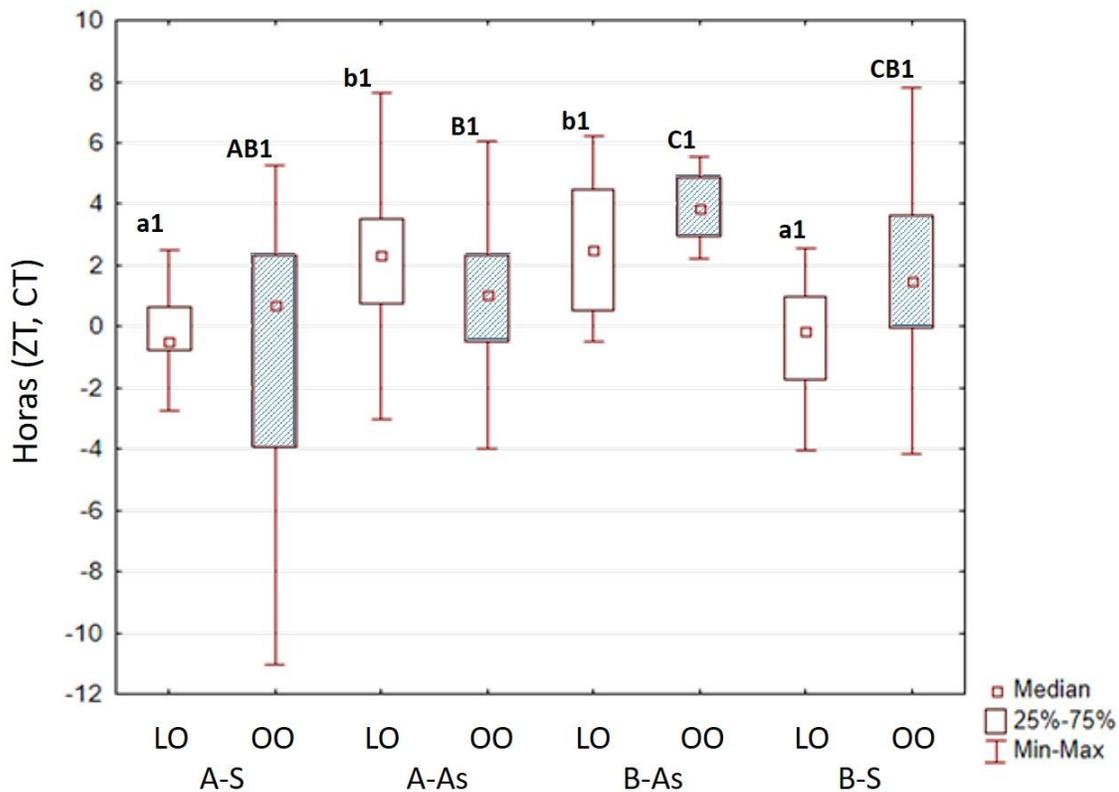


Figura 14. Diagrama de cajas en paralelo del inicio de la actividad (h) de la actividad locomotora de *A. mexicanum* en las condiciones experimentales de alimentación sincrónica (S) y asincrónica (As) e intensidad lumínica alta (A) y baja (B) en LO (cajas claras) y OO (cajas sombreadas). Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas en LO ($p < 0.05$) entre experimentos. Letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas en OO ($p < 0.05$) entre experimentos. Números diferentes denotan diferencias significativas entre LO y OO ($p < 0.05$) de cada experimento.

La **mayor actividad (acrofase)** en los ajolotes en LO con alimentación sincrónica fue similar en A-S y B-S, independiente de la intensidad de la luz ($p > 0.05$) (Fig. 15). Tanto en A-S como en B-S, la acrofase se asoció con la hora de alimentación a las 11 h (ZT 4) y se registró cerca de 1.3 h después del suministro del alimento (ZT 5.21 y 5.42, respectivamente). En los ajolotes con alimentación asincrónica, la acrofase en LO fue similar en A-As y B-As, independiente de la intensidad de la luz ($p > 0.05$). Tanto en A-As como en B-As, la acrofase se registró cerca de 8 h del encendido de la luz (ZT 7.87 y 8.16, respectivamente) y dado el suministro aleatorio del alimento, no se relacionó con los periodos asincrónicos de alimentación. Cabe destacar que en los organismos en LO con alimentación asincrónica se registró un cambio de fase de cerca de 2.3 h ($p < 0.5$) en relación a los mantenidos con alimentación sincrónica, tanto en alta como en baja intensidad lumínica.

Si bien no se registraron diferencias significativas en el registro de las acrofases entre LO y OO ($p < 0.05$), el comportamiento de la mayor actividad fue menos claro que el observado en LO. No obstante, en A-S y B-S el registro de la acrofase en OO fue similar ($p > 0.05$) (CT 4.63 y 7.65, respectivamente), mientras que en B-As la acrofase fue mayor que en A-As ($p < 0.05$) (CT 9.55 y 6.63, respectivamente).

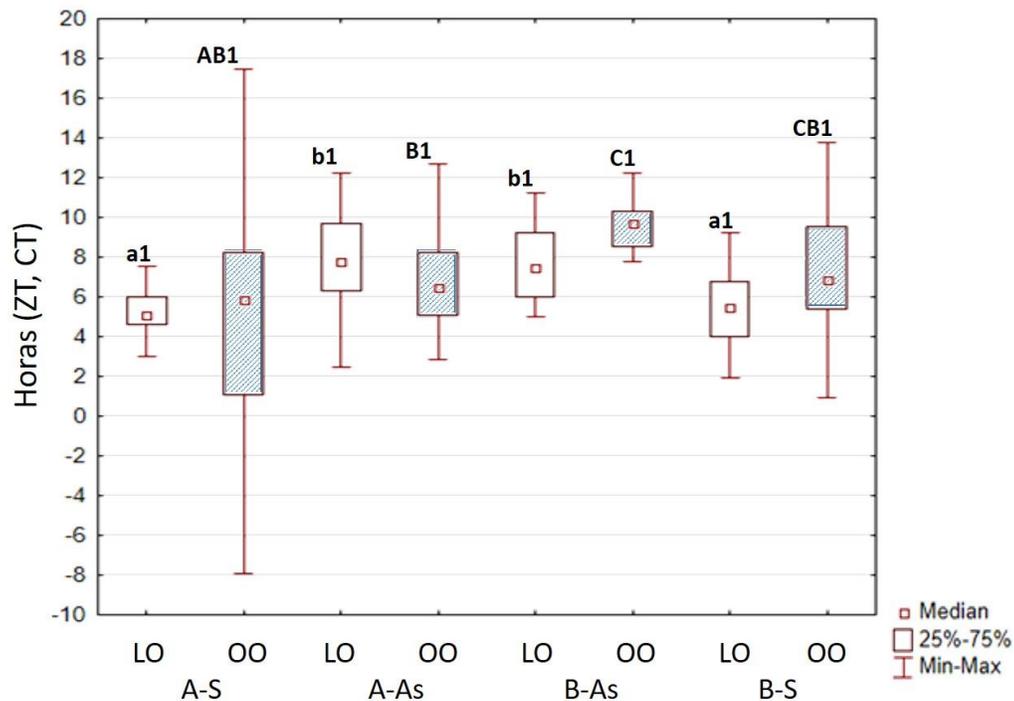


Figura 15. Diagrama de cajas en paralelo de la acrofase (h) de la actividad locomotora de *A. mexicanum* en las condiciones experimentales de alimentación sincrónica (S) y asincrónica (As) e intensidad lumínica alta (A) y baja (B) en LO (cajas claras) y OO (cajas sombreadas). Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas en LO ($p < 0.05$) entre experimentos. Letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas en OO ($p < 0.05$) entre experimentos. Números diferentes denotan diferencias significativas entre LO y OO ($p < 0.05$) de cada experimento.

Las **horas de actividad (α)** que desplegaron los ajolotes, fueron similares e independiente del patrón de alimentación e intensidad lumínica ($p > 0.05$) y se registró un intervalo general de 10.35 a 11.49 h promedio de actividad (Fig. 16). Si bien las horas de actividad en LO y OO fueron similares ($p > 0.05$) se observó una tendencia a presentar mayor variación en las horas de actividad al pasar los organismos de LO a OO.

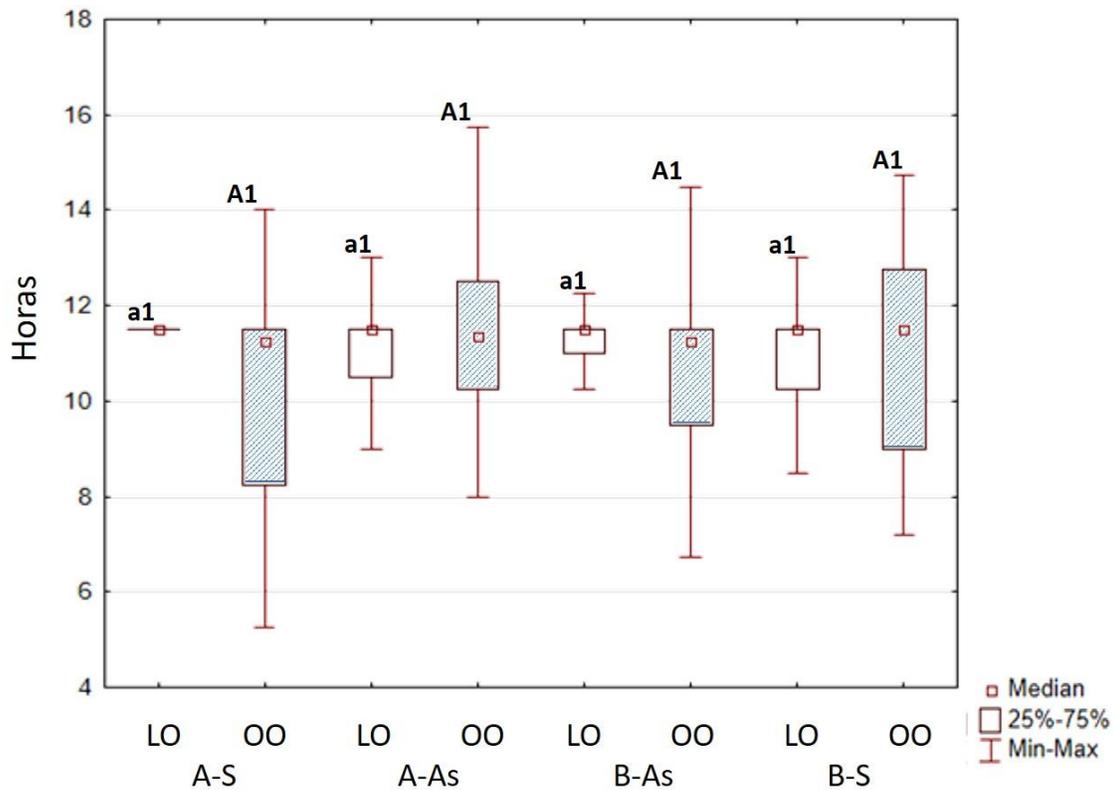


Figura 16. Diagrama de cajas en paralelo de las horas de actividad α (h) de la actividad locomotora de *A. mexicanum* en las condiciones experimentales de alimentación sincrónica (S) y asincrónica (As) e intensidad lumínica alta (A) y baja (B) en LO (cajas claras) y OO (cajas sombreadas). Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas en LO ($p < 0.05$) entre experimentos. Letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas en OO ($p < 0.05$) entre experimentos. Números diferentes denotan diferencias significativas entre LO y OO ($p < 0.05$) de cada experimento.

El comportamiento de las **horas de reposo (p)** es congruente a lo registrado en las horas de actividad de los ajolotes en las condiciones experimentales. De manera similar, no se observaron diferencias significativas en las horas de reposo de los ajolotes de las diferentes condiciones experimentales de intensidad lumínica y suministro de alimento ($p > 0.05$) en LO y en OO (Fig. 17) y se registró un intervalo global de 10.35 a 11.49 h promedio de reposo. Este parámetro fue similar entre LO y OO ($p > 0.05$) de cada condición experimental a excepción de los organismos de la condición A-S donde en OO se registró en promedio 2 h más de reposo que en LO ($p < 0.05$). Nuevamente se refuerza el patrón detectado en las horas de actividad ya que se observó una mayor dispersión en las horas de reposo de los organismos al pasar de LO a OO.

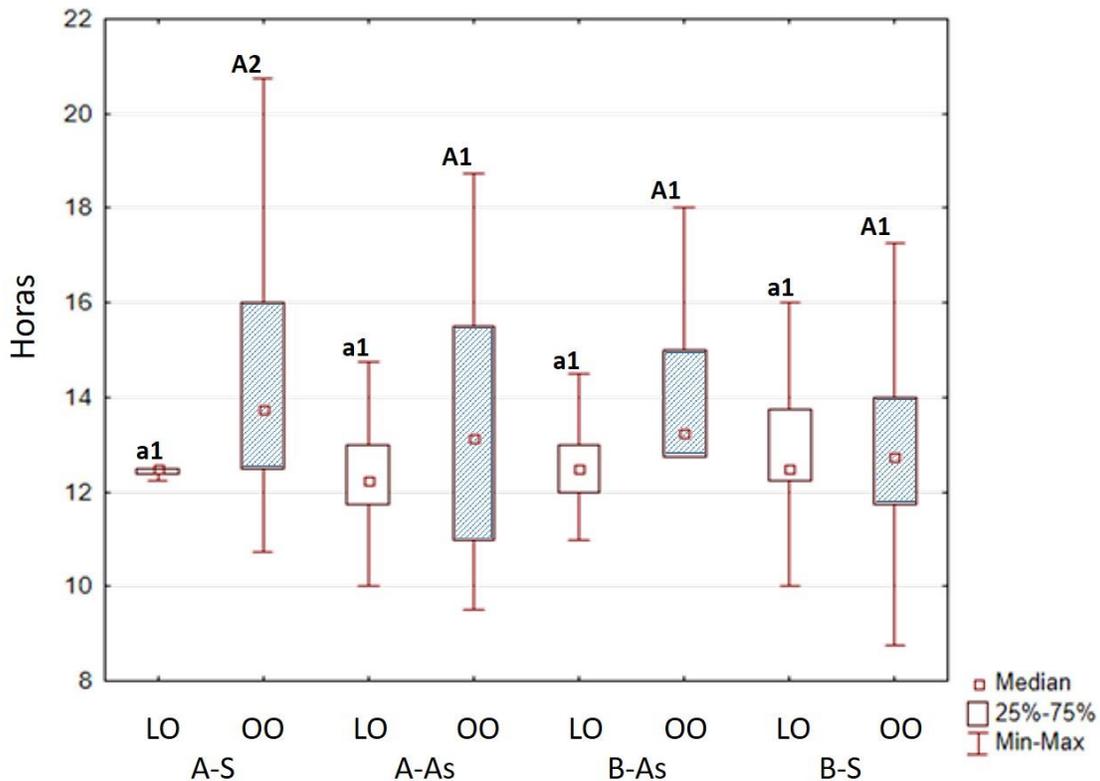


Figura 17. Diagrama de cajas en paralelo de las horas de reposo p (h) de la actividad locomotora de *A. mexicanum* en las condiciones experimentales de alimentación sincrónica (S) y asincrónica (As) e intensidad lumínica alta (A) y baja (B) en LO (cajas claras) y OO (cajas sombreadas). Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas en LO ($p < 0.05$) entre experimentos. Letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas en OO ($p < 0.05$) entre experimentos. Números diferentes denotan diferencias significativas entre LO y OO ($p < 0.05$) de cada experimento.

Respecto a la **relación α/p (horas de actividad / horas de reposo)**, se observó el mismo comportamiento descrito previamente para las horas de reposo. Esto es, no se detectaron diferencias significativas entre las condiciones y grupos experimentales ($p > 0.05$) a excepción de la condición A-S donde la razón fue menor en OO que en LO ($p < 0.05$) (Fig. 18). Al igual que en los parámetros antes descritos, se mantiene la tendencia anterior de observa una mayor dispersión en los datos en OO que en LO.

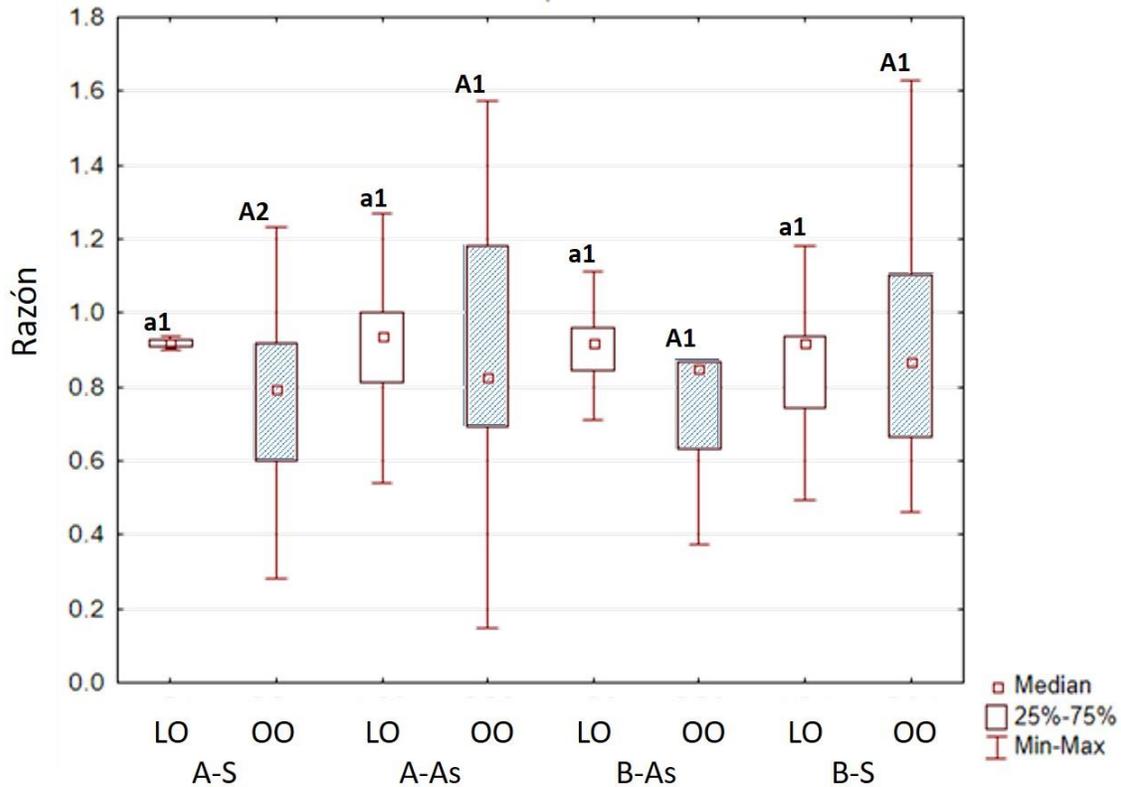


Figura 18. Diagrama de cajas en paralelo de la relación α/p (horas de actividad / horas de reposo) de la actividad locomotora de *A. mexicanum* en las condiciones experimentales de alimentación sincrónica (S) y asincrónica (As) e intensidad lumínica alta (A) y baja (B) en LO (cajas claras) y OO (cajas sombreadas). Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas en LO ($p < 0.05$) entre experimentos. Letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas en OO ($p < 0.05$) entre experimentos. Números diferentes denotan diferencias significativas entre LO y OO ($p < 0.05$) de cada experimento.

Por otro lado, en los organismos con alimentación sincrónica (A-S y B-S) en LO, los valores obtenidos de la **diferencia entre la acrofase (h) y la hora de alimentación a una hora fija (h)** (Fig. 19) así como de la **diferencia entre el suministro de alimento (h) y el inicio de actividad (h)** (Fig. 20), fueron similares ($p > 0.05$). Esto es, la intensidad lumínica no modificó los valores de estos parámetros si bien en el grupo experimental bajo intensidad lumínica menor (B-S) se registra una mayor dispersión de datos.

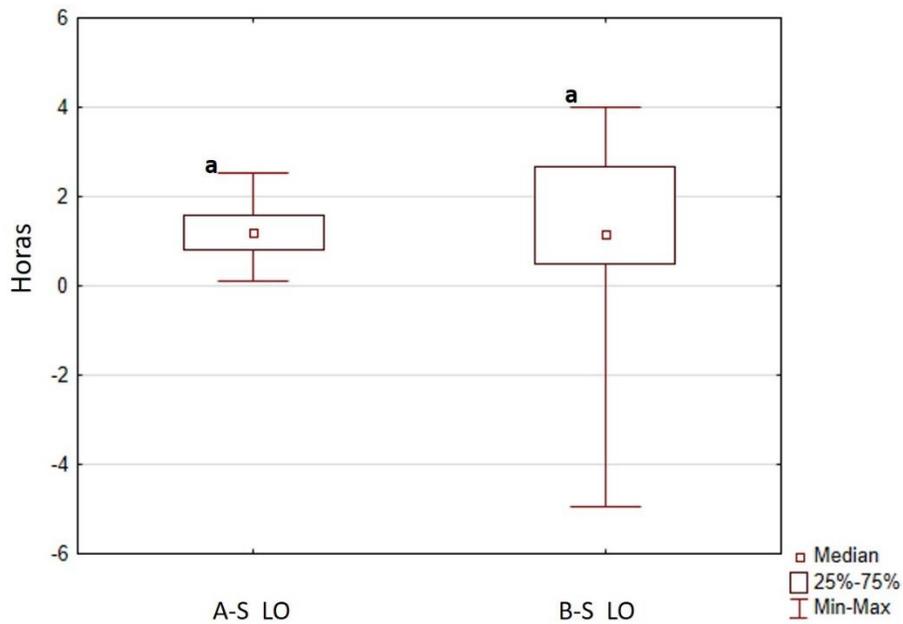


Figura 19. Diagrama de cajas en paralelo de la diferencia acrofase-alimento. El análisis se realizó solamente en los grupos experimentales en los que se suministró alimento a una hija fija (Z 4.0; 11 h) (condiciones A-S y B-S en LO). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre experimentos.

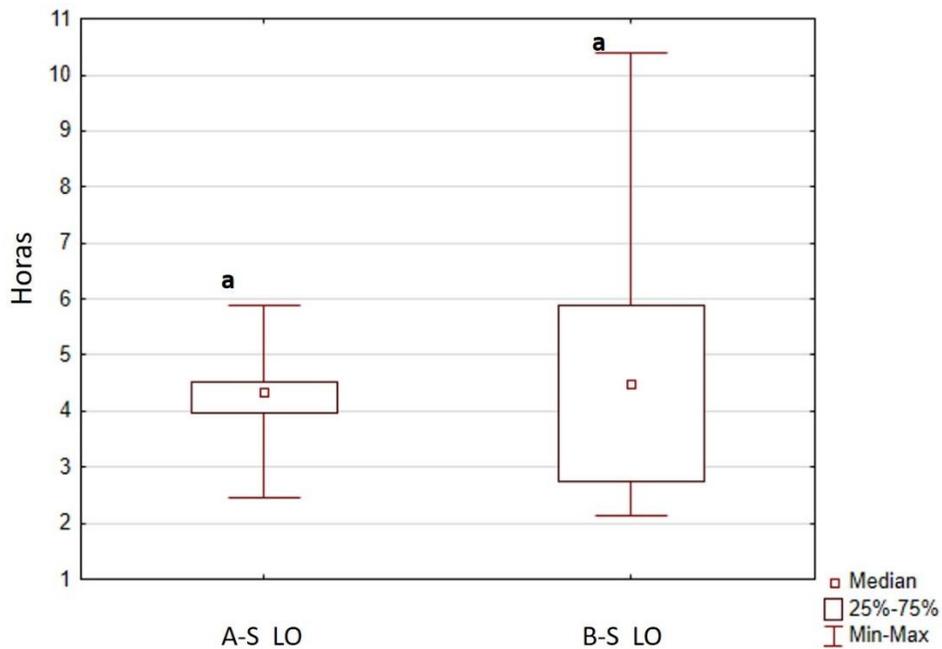


Figura 20. . Diagrama de cajas en paralelo de la diferencia alimento-inicio de actividad. El análisis se realizó solamente en los grupos experimentales en los que se suministró alimento a una hija fija (Z 4.0; 11 h) (condiciones A-S y B-S en LO). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre experimentos.

7. DISCUSIÓN

7.1 Ritmicidad circadiana de la actividad locomotora de *Ambystoma mexicanum*. Aspectos generales.

En todos los grupos animales estudiados, el ciclo de luz:oscuridad es una señal ambiental fuerte que sincroniza los ritmos biológicos con los cambios periódicos del ambiente. No obstante, la relevancia de la alimentación restringida como un sincronizador relevante de la ritmicidad circadiana ha sido demostrada en numerosos estudios, fundamentalmente en roedores (Damiola, 2000; Stokkan *et al.*, 2001; Schibler *et al.*, 2003; Boulos y Terman, 1980; Stephan 2002; Asher y Sassone-Corsi, 2015). Así, de acuerdo a la literatura revisada a la fecha en el tema, el presente estudio es el primer reporte de la evaluación de la ritmicidad circadiana de la actividad locomotora en juveniles del ajolote *Ambystoma mexicanum*, bajo dos escenarios de estímulos ambientales de sincronización, la intensidad lumínica (alta y baja, 650 y 130 luxes) y la alimentación restringida (sincrónica y asincrónica).

Hay consenso general que *A. mexicanum* es un anfibio de hábitos nocturnos en su ambiente natural (Wells, 2007; Bartra y Villadelángel, 2011; Cota, 2016). De igual manera, se reporta que tanto larvas y juveniles como adultos de *A. mexicanum* exhiben una mayor actividad nocturna bajo condiciones controladas de laboratorio en fotoperiodo LO:OO 12:12 y alimentación *ad libitum* no restringida, (Robles-Mendoza, 2011). De tal manera, durante su desarrollo ontogenético desde larvas a adultos, los organismos mantienen su comportamiento normal crepuscular o nocturno de alimentación de “espera y ataca” (*sit and wait* por su descripción en inglés), relacionado con una mayor actividad locomotora (Wells 2007; Robles-Mendoza, 2011).

No obstante, los resultados obtenidos en el presente estudio difieren del comportamiento normal reportado, ya que en lo global, los ajolotes que exhibieron un ritmo significativo, presentaron un patrón de actividad locomotor diurno, unimodal, con un periodo cercano a las 24 h, en los escenarios evaluados de los estímulos ambientales de intensidad lumínica (alta y baja) y de alimentación restringida (sincrónica y asincrónica), tanto en LO como en OO. De tal manera los resultados obtenidos de la ritmicidad circadiana de la actividad locomotora sugieren que la alimentación restringida ocasionó el cambio de fase casi completo en los ajolotes, invirtiendo su comportamiento nocturno normal a un comportamiento diurno. Estos resultados sugieren que cuando el alimento está disponible durante el periodo normal de mínima actividad de los ajolotes, el ritmo de actividad es “reajustado” de tal manera que la etapa activa corresponde al del periodo de disponibilidad del alimento. Este comportamiento ha sido descrito en ratones nocturnos sujetos a alimentación restringida durante el periodo diurno, los que expresan un cambio casi completo de fase y donde la actividad locomotora de estos ratones nocturnos es mayor en el periodo diurno de disponibilidad del alimento (revisión en Fuller *et al.*, 2008). Los

autores sugieren que este cambio de fase del patrón conductual está dado por la participación de un segundo reloj “maestro” circadiano inducible por el alimento. Como se mencionó previamente, el efecto sincronizador del alimento, localizado probablemente en el núcleo dorsoventral del hipotálamo (DMH por sus siglas en inglés) puede imponerse al reloj maestro del Sistema Nervioso Central (SNC) y dirigir los ritmos circadianos bajo condiciones de alimentación restringida. De igual manera, Damiola *et al.* (2000) reportan que en ratones nocturnos, la alimentación diurna restringida invierte casi por completo la fase del oscilador periférico en el hígado relacionado con los cambios metabólicos asociados a la disponibilidad del alimento, lo cual ocasiona un desacople entre los osciladores periféricos (i.e. hígado) y el marcapasos central (SNC) y donde el reajuste o regreso a la expresión circadiana normal y al acople entre los osciladores periféricos y el marcapasos central dependerá del ajuste de los patrones alimentarios, metabólicos y conductuales.

Si bien se desconoce si un sistema similar está operando en los ajolotes, los resultados obtenidos sugieren que el alimento es un fuerte sincronizador de la actividad locomotora circadiana de los juveniles al grado de ocasionar un cambio casi completo de fase. Al igual que ha sido descrito en pequeños mamíferos con alimentación restringida, el contar con un segundo “reloj maestro” también le permitiría a los ajolotes cambiar rápidamente sus patrones conductuales para maximizar la adquisición del alimento en etapas de mayor disponibilidad minimizando los costos de su búsqueda, lo cual tiene un gran valor adaptativo.

7.2 Efecto de la intensidad lumínica y el patrón alimentario en el ritmo de actividad y su sincronización

El fotoperiodo (ciclo luz:oscuridad) es la señal más reconocida y estudiada como sincronizador central de los ritmos biológicos con el ambiente. Al igual que ha sido reportado en numerosos grupos animales (Tosini *et al.*, 2001; Meddle *et al.*, 2002; Oishi *et al.*, 2004; Saunders, 2008; Müller *et al.*, 2013), los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que en *Ambystoma mexicanum*, el estímulo ambiental de la luz es un fuerte sincronizador de la actividad locomotora de los organismos. De manera particular, en los ajolotes con alimentación sincrónica restringida (A-S y B-S) se registra el control de periodo y control de fase, criterios que permiten sugerir esta sincronización (Moore-Ede, 1982). De igual manera, es evidente la actividad anticipatoria al encendido de la luz (inicio de actividad) de los ajolotes, actividad anticipatoria que se mantiene en los organismos de A-S en libre curso (OO) cuando el zeitgeber es retirado (Pittendrigh y Dann, 1976; Moore-Ede, 1982). Esta actividad anticipatoria al encendido de la luz se visualiza también en los ajolotes en LO en baja intensidad lumínica (B-S, LO), si bien al pasar a OO se pierde el comportamiento anticipatorio al “encendido subjetivo de la luz” en libre curso lo cual puede relacionarse con la atenuación del ritmo de actividad, lo cual será abordado posteriormente.

El efecto de la intensidad de la luz ha sido estudiado en roedores diurnos y se reporta que una mayor intensidad de luz incrementa la amplitud de la actividad locomotora (Rajaratman y Redman, 2001). De manera similar y partiendo del comportamiento diurno de *A. mexicanum*, la amplitud de la actividad locomotora de los ajolotes con alimentación restringida y sincrónica se incrementó en los organismos bajo una mayor intensidad de luz (condición A-S). Al igual que ha sido descrito en roedores diurnos, el incremento en la amplitud por el aumento de la intensidad de la luz en los ajolotes puede corresponder a un *enmascaramiento positivo* definido por el incremento de la actividad del organismo debido a un aumento en la iluminación (Salazar-Juárez et al., 2006). No obstante en los ajolotes bajo condiciones de alimentación restringida y asincrónica (As) la intensidad de la luz no modificó la amplitud de la actividad locomotora. Estos resultados sugieren que bajo estas condiciones, la alimentación no periódica, asincrónica, y por lo tanto, la búsqueda del alimento, ejerce una mayor fuerza sobre la actividad locomotora de los organismos que la baja intensidad lumínica. Los resultados obtenidos sugieren la plasticidad del ritmo de los ajolotes los cuales en la zona lacustre de Xochimilco, hábitat natural de la especie, estarían en escenarios más probables de baja intensidad de luz dado el incremento de la turbidez que se registra en el cuerpo de agua y bajo condiciones de alimentación asincrónica dada la competencia trófica con especies introducidas (Ponce de León et al., 2017).

De acuerdo a Refinetti (2008), el fenómeno de *enmascaramiento (positivo o negativo)* tiene connotaciones adaptativas relacionadas con la plasticidad del ritmo, ya que se refiere a vías de expresión alternativas en las que no interviene directamente el marcapasos, donde el enmascaramiento complementa el mecanismo de sincronización al ser una vía alterna que ayuda a los organismos a especializarse en un nicho particularmente diurno o nocturno.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, permiten proponer el efecto de la alimentación restringida como un sincronizador relevante de la actividad locomotora en *A. mexicanum* como ha sido demostrado fundamentalmente en roedores (Damiola, 2000; Stokkan et al., 2001; Schibler et al., 2003; Boulos y Terman, 1980; Stephan 2002; Bradley y Prendergast, 2014; Asher y Sassone-Corsi, 2015). El efecto sincronizador del alimento en *A. mexicanum* se sustenta considerando diversos aspectos. Por un lado y como se mencionó previamente, el suministro diurno del alimento ocasionó un cambio completo de fase, al invertir el comportamiento nocturno normal de los ajolotes a un periodo de 24 h, diurno. Por otro lado, al comparar los ajolotes con alimentación restringida sincrónica y asincrónica (S vs As), tanto en alta como en baja intensidad, la acrofase (máxima actividad) se relacionó con el suministro del alimento. Además, el desfase de 2.3 h en la alimentación asincrónica respecto a la sincrónica, sugiere que el patrón de alimentación fijo ejerció un efecto de sincronización capaz de ajustar la acrofase a la hora del suministro del alimento. Por otro lado, al comparar las condiciones A-S y A-As, la alimentación sincrónica tuvo como consecuencia una mayor amplitud (y por ende la actividad locomotora promedio), relacionada con la búsqueda y captura del alimento por los ajolotes. A la

vez, los parámetros de diferencia entre alimentación-acrofase y alimentación-inicio de actividad son consistentes con los resultados descritos previamente y revelan la relación que hay entre las fases y la hora de suministro del alimento. De tal manera, el comportamiento de estos parámetros bajo condiciones de alimentación sincrónica evidencian la capacidad del alimento de actuar como estímulo sincronizante.

Al igual que con la sincronización a la luz, cuando el estímulo del alimento ejerce sincronización debe presentarse la *actividad anticipatoria al alimento* (AAA), lo cual ha sido documentada principalmente en roedores (Mistlberger, 2009) y en pocos vertebrados acuáticos como en la carpa dorada *Carassius auratus* (Aranda *et al.*, 2001) y en el pez *Plotosus japonicus* (Kasai y Kiyohara, 2010). En *A. mexicanum* el incremento de actividad se relacionó con el suministro del alimento, comportamiento alimentario característico de anfibios de “espera y ataca” (sit and wait”) (Wells, 2007; Robles-Mendoza, 2011), si bien se requiere corroborar si este incremento de actividad obedece al comportamiento AAA como ha sido previamente descrito.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la luz y la alimentación son estímulos ambientales con una fuerte capacidad sincronizadora de la actividad locomotora en los ajolotes, que podría estar controlada por un conjunto de osciladores. La presencia e interacción entre dos osciladores, uno *sinconizable por la luz* y otro *sincronizable por el alimento* (FEO por sus siglas en inglés) que controlan las conductas de *actividad locomotora general* y *actividad específica de alimentación*, respectivamente, ha sido descrito principalmente en roedores (Damiola *et al.*, 2000; Fuller *et al.*, 2008; Mistlberger, 2009) y en el pez *Plotosus japonicus* (Kasai y Kiyohara, 2010). El contar con un reloj maestro sincronizable a la luz y un reloj maestro secundario sincronizable al alimento que juega un papel relevante en la regulación temporal de la actividad locomotora, es de gran valor adaptativo dada la relevancia de la adquisición del alimento en el desempeño de los organismos (Fuller *et al.*, 2008). De tal manera, es factible sugerir que la presencia e interacción de los dos osciladores (sincronizables a la luz y sincronizables al alimento) también ocurre en los ajolotes, aspectos que son motivo de futuros estudios.

Cabe destacar que a pesar de evidenciarse la sincronización dado el control de periodo y relación de fase estable (Moore-Ede, 1982) y caracterizar el ritmo en todas las condiciones experimentales en OO, fue evidente la reducción de la actividad locomotora de los ajolotes así como una mayor variabilidad de la actividad al pasar de LO a OO, mayor en la condición B-As caracterizada como de menor fuerza de los zeitgebers. Es posible sugerir que este comportamiento obedezca a varios aspectos. Por un lado, los bajos niveles de actividad de los ajolotes en OO pueden deberse a una propiedad intrínseca del ritmo, de verse potenciado en LO o de mostrarse atenuado en OO. La atenuación o amortiguamiento del ritmo de actividad es un fenómeno que puede presentarse al pasar un organismo de LO a condiciones constantes (i. e. LL, OO) y ocasiona que la amplitud disminuya al grado de aparentemente perderse el ritmo (Koukkari y Sothorn, 2006), lo que no implica que tal abatimiento del ritmo ocurra realmente (Bünning, 1973). Este fenómeno de atenuación

se ha descrito además en el ritmo de liberación de melatonina (reguladora del reposo y de vigilia) en las células de la glándula pineal del pollo (Zatz, 1991) así como en la ritmicidad de movimientos oculares de *Xenopus laevis* (Besharse, 1982).

Por otro lado, es posible sugerir que la variabilidad observada en la actividad de los ajolotes en libre curso obedezca a que los días de registro en OO (4 d) sean *días de ajuste del ritmo* o *ciclos transitorios de ajuste*. A diferencia de los *días transitorios* descritos por Pittendrigh *et al.* (1958) que son aquellos que se observan después de imponer un cambio de fase al ritmo, el fenómeno de *días de ajuste del ritmo a OO* o *ciclos transitorios de ajuste* se refiere a seguir observando en los primeros días en OO un ritmo de características similares al registrado en LO antes de observar el verdadero libre curso del ritmo circadiano (Lickey *et al.*, 1976; Pinotti *et al.*, 2004). Si bien este fenómeno transitorio no ha sido estudiado en anfibios, se ha reportado en otros grupos animales. Así, en *Drosophila helvetica* se observó que el ritmo en libre curso de las moscas no alcanzó un estado estable sino hasta después de transcurrir tres ciclos transitorios (Vanlalhratpuia *et al.*, 2007). Por otro lado, Daan y Pittendrigh (1976) no consideraron los tres primeros días del libre curso en roedores para el análisis del efecto de pulsos de luz por no mostrar aún estabilidad del ritmo circadiano. En moluscos del género *Aplysia* también se observaron ciclos transitorios, de 7 d, al pasar de un fotoperiodo de luz tenue a oscuridad constante (Lickey *et al.*, 1976). De tal manera, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el ritmo de la actividad locomotora de *A. mexicanum* podría verse provisionalmente como un ritmo diario que pasa por ciclos de transición antes de estabilizarse y mostrar el ritmo circadiano en OO.

De manera adicional, la mayor dispersión de los registros de actividad en OO podría estar relacionada a la expresión de *post-efectos* (aftereffects por su definición en inglés). La expresión de los post-efectos se refiere a la influencia del acondicionamiento previo o la historia previa de los organismos (i.e. fotoperiodo, patrón alimentario) antes de evaluar algunos de sus ritmos circadianos (Moore-Ede, 1982; Diegmann *et al.*, 2010; Refinetti, 2016). Considerando la historia previa de los ajolotes evaluados en este trabajo, los organismos fueron mantenidos en fotoperiodo L:O 12:12, bajo condiciones de alimentación *ad libitum*, no restringida, con una mayor actividad nocturna relacionada con la captura activa de charales. Como se mencionó previamente, los resultados obtenidos en el presente estudio denotan la fuerza de la alimentación restringida como estímulo sincronizador, al ocasionar un cambio completo de fase e invertir el comportamiento nocturno normal de los ajolotes a uno diurno. No obstante, la mayor dispersión observada en OO al ser retirados los *zeitgebers* podría sugerir la “imposición” de los hábitos nocturnos de la historia previa de los ajolotes, lo cual podría involucrar post-efectos. De tal manera, es recomendable en estudios futuros ampliar el periodo de registro en libre curso de los ajolotes (al menos 10 d en OO), considerando además la importancia de registrar la actividad antes, durante y después de exponer a los organismos a los *zeitgebers* (Boulos y Terman, 1980).

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten proponer que la luz y el alimento son estímulos ambientales con una fuerte capacidad sincronizadora del ritmo de actividad en *Ambystoma mexicanum*. La luz controla el periodo y el inicio de la actividad, mientras que el alimento tiene la capacidad de cambiar el hábito de los ajolotes de nocturno a diurno y ejercer un control específico en la acrofase relacionado con el suministro del alimento. La fuerza de los zeitgebers fue mayor en la condición A-S, ya que la amplitud se vio potenciada al recibir una intensidad de luz más alta y una alimentación sincrónica, sugiriendo que existe un efecto sincronizador diferencial de la luz y el alimento en el ritmo de actividad locomotora de *A. mexicanum*, y que dicho efecto diferencial depende de la intensidad de luz a la que sean expuestos los organismos y el patrón de alimentación al que sean acondicionados.

7.3 Aspectos a considerar en estudios futuros

Con el objetivo de reforzar la premisa del hábito naturalmente nocturno de *A. mexicanum*, se sugiere realizar futuros estudios del ritmo de la actividad locomotora de la especie analizando la duración del periodo y las horas de actividad y reposo bajo la perspectiva de las reglas de Aschoff; esto es, evaluando las modificaciones de dichos parámetros cuando los organismos son expuestos a diferentes intensidades de luz en condiciones constantes OO ó LL (Beaulé, 2008). De acuerdo con la primera regla de Aschoff (1960), intensidades de luz más altas acortan el periodo en libre curso de los organismos diurnos, mientras que éste se alarga en los organismos nocturnos. La segunda regla de Aschoff señala que en oscuridad continua, el periodo en especies diurnas tiende a ser mayor a 24 h y menor a 24 h en especies nocturnas. De acuerdo con la tercera regla, mayores intensidades de luz aumentan las horas de actividad durante el libre curso en los organismos diurnos, mientras que estas disminuyen en los organismos nocturnos, en los que aumentan las horas de reposo. Es deseable evaluar los efectos de las intensidades de luz en libre curso o condiciones constantes (LL vs OO) para conocer si las reglas de Aschoff se aplican en anfibios, pues en la revisión de Beaulé (2008) se enfatiza que las excepciones a dichas reglas se han dado principalmente en artrópodos y en mamíferos diurnos.

Por otro lado, para confirmar la sincronización del ritmo circadiano en los ajolotes por el alimento, es recomendable realizar experimentos en los que se analice el efecto particular de dicho estímulo (independientemente del estímulo luz), en condiciones de libre curso (LL o DD) con alimentación *ad libitum* restringida y no restringida, y posteriormente, en libre curso sin suministro del alimento. Dada la historia previa de mantenimiento de los ajolotes con alimentación *ad libitum*, no restringida a lo largo del día y con disponibilidad de charales en el periodo nocturno de mayor actividad, se sugiere realizar los experimentos propuestos con charales en lugar de la *Artemia* utilizada en este estudio como alimento. De igual manera, se podría evaluar si la acción de restringir el alimento y luego pasar a días de privación total tiene algún

efecto en el ritmo, como ocurre con el desacople de relojes central y periférico en ratones que pasaron por este patrón de alimentación (Damiola *et al*, 2000).

Finalmente, si bien en el presente estudio a los organismos se les suministro alimento en LO y luego se pasó a la privación total, sería recomendable evaluar en experimentos futuros si al ampliar el periodo de registro en libre curso al menos a 10 d se puede afectar la condición energética la condición energética de los ajolotes ya que los ritmos circadianos también son dependientes de la energía metabólica (Pittendrigh, 1974) y el metabolismo (Chavan *et al*. 2017).

8. CONCLUSIONES

El presente estudio constituye el primer acercamiento al comportamiento del ritmo de la actividad locomotora en *A. mexicanum* bajo dos estímulos ambientales sincronizantes, luz y alimento, y permite establecer las siguientes conclusiones.

1. Los resultados obtenidos sugieren el ritmo circadiano de actividad locomotora (cerca de 24 h) la cual se caracterizó por ser de tipo diurno y unimodal en la etapa luz-oscuridad (LO) y persistió en oscuridad continua (OO) aunque mostrando una alta variabilidad.
2. Asimismo, los resultados sugieren que la luz como estímulo ambiental actúa como un fuerte sincronizador del ritmo y según la intensidad cambia la amplitud, siendo mayor en la intensidad lumínica alta donde se observaron los mayores niveles de actividad locomotora.
3. El alimento pareció actuar como un potente sincronizador del ritmo donde la mayor parte de la actividad ocurrió durante LO, relacionado a su suministro. Esto es, el alimento ocasionó el cambio completo de fase, pasando de ser organismos de hábitos nocturnos a diurnos. Además, cuando el alimento se suministró de manera asincrónica (A-As y B-As) se observó un desplazamiento neto de la acrofase y del inicio de la actividad locomotora, respecto a las condiciones de la alimentación sincrónica (A-S y B-S).
4. La alimentación asincrónica bajo condiciones de intensidad de luz baja (B-As; menor fuerza de los sincronizadores) no ejerció un control suficiente que impidiera la sincronización por parte de la luz, lo cual se evidencia en el periodo de OO.
5. Los resultados obtenidos sugieren la sinergia del papel sincronizador de la luz y del alimento, y de la fuerza de estos estímulos, mayor en condiciones de elevada intensidad lumínica y alimentación sincrónica.

6. En el periodo OO, el ritmo se atenúa conforme pasa el tiempo de registro. Al contar con sólo 4 días de registro no es factible contar con una clara explicación de la variabilidad observada en esta etapa. Es posible suponer que los registros denoten un estado del ritmo marcado por la experiencia previa (post-efectos) o por la expresión de días de ajuste del ritmo hacia el estado estable del mismo.

9. RECOMENDACIONES

El ajolote *Ambystoma mexicanum* está catalogado como especie en peligro crítico de extinción en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN y sujeta a protección especial por la NOM-059-SEMARNAT-2010 por parte de la legislación mexicana. La conservación exitosa de *A. mexicanum* dependerá en parte de su adecuado manejo y mantenimiento en condiciones de laboratorio, procedimientos previos a los programas de reintroducción que se propongan en el futuro. Esto implica no sólo una adecuada dieta y óptima calidad del agua, sino el estudio de sus ritmos biológicos, dada la relevancia adaptativa de los mismos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se postula el papel sincronizador de la luz y del alimento en la actividad locomotora circadiana de los juveniles de *A. mexicanum*. Sin embargo, a fin de contar con información complementaria y concluyente sobre el papel sincronizador de los estímulos analizados se sugiere implementar diseños experimentales que incorporen tanto el seguimiento de la conducta locomotora de los ajolotes con alimentación *ad libitum* y constante (periodo diurno y nocturno) como la ampliación de los días de registro en libre curso (oscuridad constante) con y sin suministro del alimento. Ello aportará información valiosa de los estados estables del ritmo de actividad, la duración de los días de ajuste entre estos y/o la probable manifestación de post efectos relacionados con la experiencia ambiental previa.

10. LITERATURA CITADA

Aguilar-Miguel X. 2005. *Ambystoma mexicanum*. Algunas especies de anfibios y reptiles contenidos en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000. Facultad de Ciencias, Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México. Bases de datos SNIBCONABIO. Proyecto W035. México. D.F

Aguilar-Roblero R., V. Carmona-Alcocer y M. L. Fanjul de Moles. 2008. Los ritmos circadianos. *En: Fanjul, M. L. y M. Hiriart (editoras). Biología funcional de los animales Vol. II. 2da ed. Editorial Siglo XXI. México. pp 327-351.*

Anaya, E. 1998. The mythical mexican axolotl. *Voices of Mexico*. 42: 96-98.

Aranda A., J. A. Madrid and F. J. Sánchez-Vázquez. 2001. Influence of light on feeding anticipatory activity in goldfish. *Journal of Biological Rhythms*. 16 (1): 50-57.

Asashima M., G. M. Malacinski and S. C. Smith. 1989. Surgical manipulations of embryo. *In: Armstrong, J. B. and G. M. Malacinski (editors). Developmental biology of the axolotl. Oxford University Press. New York. pp. 255-263.*

Asher G. and P. Sassone-Corsi. 2015. Time for food: the intimate interplay between nutrition, metabolism, and the circadian clock. *Cell*. 161: 84-92.

Bartra R. y G. Villadelángel. 2011. Axolotiada. Vida y mito de un anfibio mexicano. *Fondo de Cultura Económica. Ciudad de México. pp. 416.*

Beulé C. 2008. Aschoff's rules. *In: Binder M. D. N. Hirokawa and U. Windhorst (editors). Encyclopedia of neuroscience. Springer. Berlin.*

Bertolucci C. and A. Foà. 2004. Extraocular reception and circadian entrainment in nonmammalian vertebrates. *Chronobiology International*. 21 (4-5): 501-519.

Bordzilovskaya N. P., T. A. Dettlaff, S. T. Duhon and G. M. Malacinski. 1989. Developmental-stage series of axolotl embryos. *In: Armstrong, J. B. and G. M. Malacinski. 1989. Developmental Biology of the axolotl. Oxford University Press. New York. pp. 319.*

Besharse J. C. 1982. The daily light-dark cycle and rhythmic metabolism in the photoreceptor-pigment epithelial complex. *Progress in Retinal and Eye Research*. 1: 81-124.

Boulos Z. and M. Therman. 1980. Food availability and daily biological rhythms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 4: 119-131.

Bradley S. P. and B. J. Prendergast. 2014. Adaptation to short photoperiods augments circadian food anticipatory activity in Siberian hamsters. *Hormones and Behavior*. 66: 159-168.

- Brandon R. A. 1989. Natural history of the axolotl and its relationship to other ambystomatid salamanders. *In: Armstrong, J. B. and G. M. Malacinski (editors). Developmental biology of the axolotl. Oxford University Press. New York. pp. 255-263.*
- Bünning E. 1973. Light-induced phase shifts of circadian leaf movements of *Phaseolus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 69: 2732-2733.
- Caballero-Pérez J., A. Espinal-Centeno, F. Falcon, L. F. García-Ortega, E. Curiel-Quesada, A. Cruz-Hernández, A. Cruz-Hernández, L. Bako, X. Chen, O. Martínez, M. A. Arteaga-Vázquez, L. Herrera-Estrella and A. Cruz. Ramírez. 2018. Transcriptional landscapes of axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Developmental Biology*. 433 (2): 227-239.
- Casas G., R. Cruz y X. Aguilar. 2003. Un regalo poco conocido de México al mundo: el ajolote o axolotl (*Ambystoma*: Caudata: Amphibia) Con algunas notas sobre la crítica situación de sus poblaciones. *CIENCIA ergo sum*. 10 (3): 304-308.
- Chavan R., U. Albrecht and T. Okabe. 2017. Circadian clocks, metabolism, and food-entrained rhythms. *In: Kuman. V. (editor). Biological timekeeping: clocks, rhythms and behaviour. Springer. India. pp. 427-442.*
- Cota A. 2016. El ajolote. Biología del anfibio más sobresaliente del mundo. *Elefanta editorial*. Ciudad de México. pp. 62.
- Daan S. and C. S. Pittendrigh. 1976. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of Comparative Physiology*. 106 (3): 267-290.
- Damiola F., N. Le Minh, N. Preitner, B. Kornmann, F. Fleury-Olela and U. Schibler. 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes and development*. 14 (23): 2950-2961.
- DGCOH. 2005. Plan de acciones hidráulicas 2001-2005. *Departamento del Distrito Federal, Dirección General de Construcción y Operación Hidráulica*. México. pp. 110.
- Diegmann J., A. Stück, C. Madeti and T. Roenneberg. 2016. Entrainment elicits period aftereffects in *Neurospora crassa*. *Chronobiology International*. 27 (7): 1335-1347.
- Duméril A. H. A. 1872. Notes complémentaires sur les axolotls. *Mémoires de la Société Linnéenne de Normandie*. 2: 248-251.
- Dunlap J. C. 2003. Overview of biological timing from unicells to humans. *In: Dunlap J.C., J. J. Loros and P. J. DeCoursey. Chronobiology: Biological timekeeping. Sinauer Associates, Inc. pp. 382.*
- Enright J. T. 1981. Methodology. *In: Aschoff J. (editor). Handbook of behavioral neurobiology. Volume 4 Biological rhythms. Plenum Press. New York. pp. 59-60.*

- Foster R.G., M. S. Grace, I. Provencio and W. J. DeGrip. 1994. Identification of vertebrate deep brain photoreceptor. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 18: 541-546.
- Fuller P. M., J. Lu and C. B. Saper. 2008. Differential rescue of light- and food-entrainable circadian rhythms. *Science*. 320 (5879): 1074-1077.
- Galton V. A. 1992. The role of thyroid hormone in amphibian metamorphosis. *Trends in Endocrinology*. 3: 96-100.
- García P. 2013. Detección de factores putativos de virulencia en especies de *Aeromonas* aisladas del agua y de la piel del ajolote (*Ambystoma mexicanum*) en la zona lacustre de Xochimilco, México. Tesis de maestría. Instituto de Geología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. pp 82.
- Geiger S. S., C. T. Fagundes and R. M. Siegel. 2015. Chrono-immunology: progress and challenges in understanding links between the circadian and immune systems. *Immunology*. 146 (3): 349-358.
- Griffiths H. I. and D. H. Thomas. 1992. Aquatic oxygen conformity in the Mexican axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Herpetological journal*. 2: 1-4.
- Groef B. D., S. V. H. Grommen and V. M. Darras. 2018. Forever young: endocrinology of paeodomorphosis in the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *General and comparative endocrinology*. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2018.05.016>.
- Grunsven R. van, R. Creemers, K. Joosten, M. Donners and E. Veenendal. 2016. Behavior of migrating toads under artificial lights differs from other phases of their light cycle. *Amphibia-Reptilia*. 38 (1). DOI: 10.1163/15685381-00003081.
- Guelke E., V. Bucan, C. Liebsch, A. Lazaridis, C. Radtke, P. M. Vogt and K. Reimers. 2015. Identification of reference genes and validation for gene expression studies in diverse axolotl (*Ambystoma mexicanum*) tissues. *Gene*. 560 (1): 114-123.
- Haas B. J. and J. L. Whited. 2017. Advances in decoding axolotl limb regeneration. *Trends in genetics*. 33 (8): 553-565.
- Halliday T. R. and A. Worsnop. 1977. Correlation between activity and breathing rate in the smooth newt, *Triturus vulgaris* (Amphibia, Urodela, Salamandridae). *Journal of Herpetology*. 11: 244-246.
- Jacobs G. F. M. and E. R. Kühn. 1988. Luteinizing hormone-releasing hormone induces thyroxine release together with testosterone in the neotenic axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *General and comparative endocrinology*. 71 (3): 502-505.
- Jud C., I. Schmutz, G. Hampp, H. Oster and U. Albrecht. 2005. A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lightning conditions. *Biological Procedures Online*. 7: 101-116.

Kasai M. and S. Kiyohara. 2010. Food- and light-entrainable oscillators control feeding and locomotor activity rhythms, respectively, in the Japanese catfish, *Plotosus japonicus*. *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, sensory neural and behavioral physiology*. 196 (12): 901-912.

Koukkari W. L. and R. B. Sothorn. 2006. Introducing biological rhythms: A primer on the temporal organization of life, with implications for health, society, reproduction, and the natural environment. *Springer Science*. New York. pp. 655.

Kühn E. R., B. D. Groef, S. V. H. Grommen, S. V. der Geyten and V. M. Darras. 2004. Low submetamorphic doses of dexamethasone and thyroxine induce complete metamorphosis in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*) when injected together. *General and comparative endocrinology*. 137 (2): 141-147.

Lamia K. A., K. Storch and C. J. Weitz. 2008. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105 (39): 15172-15177.

Landry G. J., G. R. S. Yamakawa and R. E. Mistlberger. 2007. Robust food anticipatory activity circadian rhythms in rats with complete ablation of the thalamic paraventricular nucleus. *Brain Research*. 1141: 108-118.

Landry G. J. and R. E. Mistlberger. 2007. Food entrainment: methodological issues. *Journal of Biological Rhythms*. 22 (6): 484-487.

Lemansky L. F. 1973. Morphology of developing heart in cardiac lethal mutant Mexican axolotls, *Ambystoma mexicanum*. *Developmental biology*. 33: 312-333.

Lickey M. E., G. D. Block, D. J. Hudson and J. T. Smith. 1976. Circadian oscillators and photoreceptors in the gastropod, *Aplysia*. *Photochemistry and Photobiology*. 23 (4): 253-273.

Mistlberger R. E. and E. G. Marchant. 1995. Computational and entrainment models of circadian food anticipatory activity: evidence from non-24 h feeding schedules. *Behavioral Neuroscience*. 109: 790-798.

Mistlberger R. E. 2009. Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *European Journal of Neuroscience*. 30: 1718-1729.

Meddle S. L., G. E. Bentley and V. M. King. 2002. Photoperiodism in birds and mammals. In: Humar V. (editors). *Biological Rhythms*. Springer. Berlin. pp. 192-206.

Mena H. y E. Servín. 2014. Manual básico para el cuidado en cautiverio del ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*). *Instituto de Biología*. México, Distrito Federal. pp. 34.

Menaker M., L. F. Moreira and G. Tosini. 1997. Evolution of circadian organization in vertebrates. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 30: 305-313.

Moore-Ede M. C. 1982. The clocks that time us: Physiology of the circadian timing system. *Harvard University Press*. Cambridge. pp. 448.

Müller W. E. G, H. C. Schröder, D. Psignano J. S. Markl and X. Wang. 2013. Metazoan circadian rhythm: toward an understanding of a light-based zeitgeber in sponges. *Integrative and Comparative Biology*. 53 (1): 103-117.

Nagai K. and T. Oishi. 1998. Behavioral rhythms of the Japanese newts, *Cynops pyrrhogaster*, under a semi-natural condition. *International Journal of Biometeorology*. 41: 105-112.

Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA I-1994.

Nye H. L. D., J. A. Cameron, E. A. G. Chernoff and D. L. Stocum. 2003. Extending the table of stages of normal development of the axolotl: limb development. *Developmental Dynamics*. 226: 555-560.

Oishi T., K. Nagai, Y. Harada, M. Naruse, M. Ohtani, E. Kawano and S. Tamotsu. 2004. Circadian rhythms in amphibians and reptiles: ecological implications. *Biological Rhythm Research*. 35: 105-120.

Palerm A. 1973. Obras hidráulicas prehispánicas en el Sistema lacustre del Valle de México. *INAH*. México. pp. 244.

Palmer J. D., F. A. Brown and L. N. Edmunds. 1976. An introduction to biological rhythms. *Academic Press, Inc.* Reino Unido. 375 pp.

PAOT. 2012. Tendencias y propuestas sobre el hundimiento de la zona del ANP "Ejidotes de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco". Informe Técnico. Ciudad de México. 79 pp.

Pendergast J. S and S. Yamazaki. 2014. Effects of light, food, and methamphetamine on the circadian activity rhythm in mice. *Physiology and Behavior*. 128: 92-98.

Pinotti M., C. Bertolucci, F. Portaluppi, I. Colognesi, E. Frigato, A. Foà and F. Bernardi. 2004. Daily and circadian rhythms of Tissue Factor Pathway Inhibitor and Factor VII activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2005. 25: 646-649.

Pittendrigh C. S., V. Bruce and P. Kaus. 1958. On the significance of transients in daily rhythms. *Proceedings of the National Academy of Sciences. Physiology*. 44: 965-973.

Pittendrigh C. S. 1974. Circadian oscillations in cells and the circadian organization of multicellular systems. In: Schmitt. F. O. and F. G. Worden (editors). *The neurosciences: third study program*. MIT Press. Cambridge, Massachusetts. pp. 437-458.

Pittendrigh C. S. and Daan S. 1976. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: A clock for all seasons. *Journal of Comparative Physiology A*. 106: 333-355.

Pittendrigh C. S. 1981. Circadian systems: general perspective. *In: Aschoff J. (editor) Handbook of behavioral neurobiology. Volume 4 Biological rhythms. Plenum Press. New York. pp. 59-60.*

Ponce de León C., Cram S., M. P. Fernández, I. Rosas y C. Vanegas. 2017. Modelos conceptuales para el análisis del impacto de contaminantes. Un estudio de caso: Xochimilco. *Las prensas de Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. 76 pp.*

Refinetti R. 2006. Circadian physiology. 2da ed. *Taylor and Francis Group CRC Press. pp. 667.*

Refinetti R. 2006. Dictionary of circadian physiology. *In: Refinetti R. Circadian physiology. 2da ed. Taylor and Francis Group CRC Press. pp 631-648.*

Refinetti R. 2008. Biological rhythms. *In: Encyclopedia of Ecology. Volume 1 A-C. Elsevier B. V. Amsterdam. pp. 423.*

Reib C., L. Olsson and U. Hobfeld. 2015. The history of the oldest self-sustaining laboratory animal: 150 years of axolotl research. *Journal of Experimental Zoology Part A. 324 (5): 393-404.*

Robles M. B. 2011. Ritmo circadiano de actividad locomotriz en el ajolote mexicano juvenil *Ambystoma mexicanum*: sincronización y libre curso. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, *Universidad Nacional Autónoma de México*, Ciudad de México. pp. 44.

Robles-Mendoza C., C. E. García-Basilio and R. C. Vanegas-Pérez. 2009. Maintenance media for the axolotl *Ambystoma mexicanum* juveniles (Amphibia: Caudata). *Hidrobiológica. 19 (3): 205-210.*

Robles-Mendoza C. 2011. Procedimiento Estandarizado de Operación: Mantenimiento de organismos de *Ambystoma mexicanum* en condiciones de laboratorio. Versión 2. *Unidad de Análisis Ambiental, UNAM. pp. 24.*

Robles-Mendoza C., S. R. Zúñiga-Lagunes, C. A. Ponce de León-Hill, J. Hernández-Soto and C. Vanegas-Pérez. 2011. Esterases activity in the axolotl *Ambystoma mexicanum* exposed to chlorpyrifos and its implication to motor activity. *Aquatic Toxicology. 105: 728-734.*

Rosenkilde P. and A. P. Ussing. 1996. What mechanisms control neoteny and regulate induced metamorphosis in urodeles? *International Journal of Developmental Biology. 40: 665-673.*

Roy S. and S. Gatién. 2008. Regeneration in axolotls: a model to aim for!. *Experimental Gerontology. 43: 968-973.*

Rudic R. D., P. McNamara, A-M Curtis, R. C. Boston, S. Panda, J. B. Hogenesch and G. A. FitzGerald. 2004. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol. 2 (11): e377.*

- Salazar-Juárez A., L. Parra-Gámez, S. Barbosa-Méndez, P. Leff y B. Antón. 2006. Enmascaramiento. Un tipo de sincronización. Primera parte. *Salud Mental*. 29 (6): 39-47.
- Saunders D. 2008. Photoperiodism in insects and other animals. In: Björn L. O. (editor) *Photobiology*. Springer. New York. pp. 389-416.
- Sawin C. T., J. L. Bolaffi, I. P. Callard, P. Bacharach and I. M. D. Jackson. 1978. Induced metamorphosis in *Ambystoma mexicanum*: lack of effect in triiodothyronine on tissue or blood levels of thyrotropin-releasing hormone (TRH). *General and comparative endocrinology*. 36 (3): 427-432.
- Schibler U., J. Ripperger and S. A. Brown. 2003. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *Journal of biological rhythms*. 18 (3): 250-260.
- Schmid B. C. Helfrich-Förster and T. Yoshii. 2011. A new ImageJ plugin "ActogramJ" for chronobiological analyses. *Journal of Biological Rhythms*. 26: 464-467.
- Schreckenberg G. M. and A. G. Jacobson. 1975. Normal stages of development of the axolotl *Ambystoma mexicanum*. *Developmental Biology*. 42: 391-400.
- Scopoli J. A. 1777. Introductio ad historiam natvralem sistens genera lapidvm, plantarvm, et animalivm hactenus detecta, caracteribvs essentialibvs donata, in tribvs divisa, svbinde ad leges natvrae.
- Shaw G. 1798. *Gyrinus mexicanus* Shaw. In: Shaw, *Naturalist's Miscellany*. 9: 343-344.
- Sharma V. K. and M. K. Chandrashekar. 2005. Zeitgebers (time cues) for biological clocks. *Current Science*. 7 (89): 1136-1146.
- Shumway C. A. 1999. A neglected science: applying behaviour to aquatic conservation. *Environmental biology of fishes*. 55: 183-201.
- Smith H. M. 1969. The Mexican axolotl: some misconceptions and problems. *BioScience*. 19 (7): 593-597.
- Smith J. J., S. Putta, W. Zhu, G. M. Pao, I. M. Verma, T. Hunter, S. B. Bryant, D. M. Gardiner, T. T. Harkins and S. R. Voss. 2009. Genic regions of a large salamander genome contain long introns and novel genes. *BioMed Central Genomics*. 10:19
- Stephan F. K. 1992. Resetting of a feeding-entrainable circadian clock in the rat. *Physiology & Behavior*. 52: 985-995.
- Stokkan K. A., S. Yamazaki, H. Tei, Y. Sakaki and M. Menaker. 2001. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*. 291 (5503): 490-3.
- Storch K.-F. and C. Weitz. 2009. Daily rhythms of food-anticipatory behavioral activity do not require the known circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106: 6808-6813.

Tassava R. A. 1983. Limb regeneration to digit stages occurs in well-fed adult newts after hypophysectomy. *Journal of Experimental Zoology*. 225: 433-441.

Taylor D. H. and K. Adler. 1973. Spatial orientation by salamanders using plane-polarized light. *Science*. 181 (96): 285-287.

Taylor D. H. and K. Adler. 1978. The pineal body: site of extraocular perception of celestial cues for orientation in the tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*). *Journal of Comparative Physiology. A*. 124: 357-361.

Tosini G., A. Foa and C. Bertolucci. 2001. The circadian system of reptiles: a multioscillatory and multiphotoreceptive system. *Physiology and Behavior*. 72 (4): 461-471

Vadillo S. 2015. Efecto subletal del cadmio en el ajolote *Ambystoma mexicanum*: ritmicidad diaria del metabolismo aerobio y respuestas al estrés oxidante. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, *Universidad Nacional Autónoma de México*, Ciudad de México. pp. 73.

Vanlalhriatpuia K., V. Chhakchhuak, S. K. Moses, S. B. Iyyer, M. S. Kasture, A. J. Shivagaje, B. J. Rajneesh and D. S. Joshi. 2007. Effects on altitude on circadian rhythm of adult locomotor activity in Himalayan strains of *Drosophila helvetica*. *Journal of Circadian Rhythms*. pp. 11.

Vollmers C., S. Gill, L. DiTacchio, S. R. Pulivarthy, H. D. Le and S. Panda. 2009. Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythm in hepatic gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106 (50): 21453-21458.

Wakahara M. 1996. Heterochrony and neotenic salamanders: possible cues for understanding the animal development and evolution. *Zoological Science*. 13: 765-776.

Wells K. D. 2007. The ecology and behavior of amphibians. *The University of Chicago Press*. Chicago. pp. 622.

Wright M. L. 2002. Melatonin, diel rhythms and metamorphosis in anuran amphibians. *General and Comparative Endocrinology*. 126: 251-254.

Wright M. L. and N. K. Bruni. 2004. Influence of the photocycle and thermocycle on rhythms of plasma thyroxine and plasma and ocular melatonin in late metamorphic stages of the bullfrog tadpole, *Rana catesbeiana*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 139: 33-40.

Wright M. L., L. L. Francisco, J. L. Scott, S. E. Richardson, J. A. Carr, A. B. King, A. G. Noyes and R. F. Visconti. 2006. Effects of bilateral and unilateral ophthalmectomy on plasma melatonin in *Rana* tadpoles and froglets under various experimental conditions. *General and comparative endocrinology*. 147: 158-166.

Yerushalmi S. and R. M. Green. 2009. Evidence for the adaptive significance of circadian rhythms. *Ecology Letters*. 12: 970:981.

Yoshikawa T. and T. Oishi. 1998. Extraretinal photoreception and circadian systems in nonmammalian vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 119B (1): 65-72.

Zambrano L., E. Vega, G. Herrera, E. A. Prado and V. H. Reynoso. 2007. A population matrix model and population viability analysis to predict the fate of an endangered species in a highly managed water system. *Animal Conservation*. 10: 297-303.

Zambrano L., E. Valiente and M. J. Zanden. 2010. Food web overlap among native axolotl *Ambystoma mexicanum* and two exotic fishes: carp (*Cyprinus carpio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Xochimilco, Mexico City. *Biological Invasions*. 12: 3061-3069.

Zatz M. 1991. Light and norepinephrine similarly prevent damping of the melatonin rhythm in cultured chick pineal cells: regulation of coupling between the pacemaker and overt rhythms? *Journal of Biological Rhythms*. 6 (2): 137-147.

ANEXO I. MÉTODO DE ANÁLISIS DE PERIODOGRAMA

Como primer paso para caracterizar el ritmo de actividad locomotora y evaluar la sincronización, se utilizó la función “Determining the freetunning period automatically” del complemento ActogramJ en ImageJ la cual sigue el método de Análisis de Periodograma, que se explica a continuación.

Dada una serie de componentes periódicos (que en este caso son los niveles de actividad que el sistema RALM registra cada 15 min), el gráfico llamado periodograma mide las aportaciones a la varianza total de estos niveles de actividad a diferentes frecuencias (minutos transcurridos, que constituyen el eje horizontal). Así, el periodograma puede presentar uno o más “picos” en alguna(s) frecuencia(s). El (los) “pico”(s) significa(n) que dicha frecuencia es más importante que las otras, pues es dicha frecuencia en la que se da una mayor aportación a la varianza total. Para determinar si el pico en alguna frecuencia es significativo (lo que significa que dicha frecuencia es la duración del periodo), el programa grafica una línea de significancia de acuerdo a las especificaciones señaladas por el usuario (en este caso se especificó un nivel de $p = 0.05$). Cuando se detecta un pico mayor a la línea de significancia- p , ese valor de frecuencia (en minutos) es considerado como la duración del periodo y éste se considera significativo. En los ajolotes analizados en los que ningún pico fue mayor a la línea de significancia, el periodo se consideró no significativo y por lo tanto no se obtuvieron los demás parámetros (i.e. acrofase, amplitud, etc) que caracterizarían el ritmo de la actividad locomotora de los organismos.

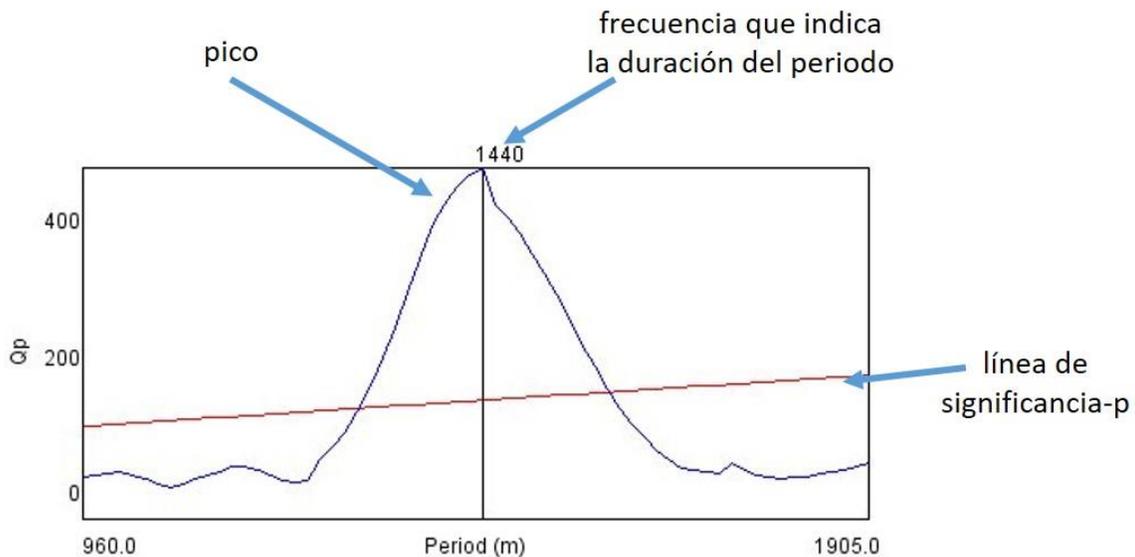


Figura 21. Periodograma del organismo de la cámara 1, arena 1, de la condición experimental A-S LO (intensidad lumínica alta y alimentación sincrónica; luz:oscuridad) obtenido con ActogramJ, mostrando un periodo significativo ($p < 0.05$) de 1440 minutos (24 h).

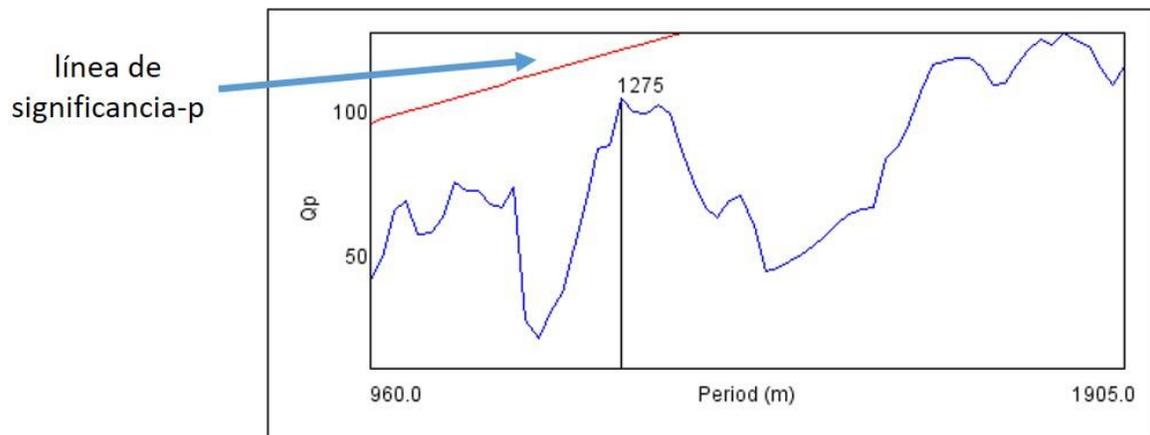


Figura 22. Periodograma del organismo de la cámara 1, arena 3, de la condición experimental B-As LO (intensidad lumínica baja y alimentación asincrónica; luz:oscuridad) obtenido con ActogramJ mostrando un periodo no significativo ($p > 0.05$).

ANEXO II. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS ESTADÍSTICAS

1. Comparaciones múltiples

Resultados de los análisis de comparación múltiple entre condiciones experimentales. Análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis (STATISTICA ver. 10, StatSoft Inc, 2011). Valores de las celdas en rojo indican diferencias significativas entre condiciones experimentales.

1.1 Mediciones morfométricas

Peso húmedo

Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); Peso				
Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales				
Prueba Kruskal-Wallis: H (3, N= 48) =4.160953 p =.2446				
Depend.:	A-S	A-As	B-As	B-S
Peso	R:20.292	R:30.333	R:20.958	R:26.417
A-S		0.473583	1.000000	1.000000
A-As	0.473583		0.605678	1.000000
B-As	1.000000	0.605678		1.000000
B-S	1.000000	1.000000	1.000000	

Longitud patrón

Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); Longitud patrón				
Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales				
Prueba Kruskal-Wallis: H (3, N= 48) =3.074147 p =.3803				
Depend.:	A-S	A-As	B-As	B-S
Long. pat.	R:21.208	R:22.083	R:30.250	R:24.458
A-S		1.000000	0.681949	1.000000
A-As	1.000000		0.918251	1.000000
B-As	0.681949	0.918251		1.000000
B-S	1.000000	1.000000	1.000000	

Longitud total

Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); Longitud total				
Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales				
Prueba Kruskal-Wallis: H (3, N= 48) =1.538499 p =.6734				
Depend.:	A-S	A-As	B-As	B-S
Long. tot.	R:20.292	R:25.375	R:25.500	R:26.833
A-S		1.000000	1.000000	1.000000
A-As	1.000000		1.000000	1.000000
B-As	1.000000	1.000000		1.000000
B-S	1.000000	1.000000	1.000000	

1.2. Parámetros fisicoquímicos

Temperatura

Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); Temperatura en °C Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales Prueba Kruskal-Wallis: H (3, N= 41) =2.821262 p =.4200						
Depend.: T °C	A-S	A-As	B-As	B-S		
	R:18.250	R:18.958	R:21.833	R:25.773		
A-S		1.000000	1.000000	0.794822		
A-As	1.000000		1.000000	1.000000		
B-As	1.000000	1.000000		1.000000		
B-S	0.794822	1.000000	1.000000			

pH

Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); pH Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales Prueba Kruskal-Wallis: H (3, N= 41) =34.04213 p =.0000						
Depend.: pH	A-S	A-As	B-As	B-S		
	R:18.292	R:7.0417	R:29.833	R:34.364		
A-S		0.128556	0.323908	0.007850		
A-As	0.128556		0.000850	0.000000		
B-As	0.323908	0.000850		1.000000		
B-S	0.007850	0.000000	1.000000			

Amonio total

Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); Amonio Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales Prueba Kruskal-Wallis: H (3, N= 39) =8.531077 p =.0362						
Depend.: Amonio	A-S	A-As	B-As	B-S		
	R:23.083	R:24.833	R:16.250	R:12.727		
A-S		1.000000	1.000000	0.177361		
A-As	1.000000		1.000000	0.065824		
B-As	1.000000	1.000000		1.000000		
B-S	0.177361	0.065824	1.000000			

Oxígeno disuelto

Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); Oxígeno Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales Prueba Kruskal-Wallis: H (3, N= 40) =1.869035 p =.6000						
Depend.: Oxígeno	A-S	A-As	B-As	B-S		
	R:18.583	R:23.833	R:21.000	R:18.500		
A-S		1.000000	1.000000	1.000000		
A-As	1.000000		1.000000	1.000000		
B-As	1.000000	1.000000		1.000000		
B-S	1.000000	1.000000	1.000000			

1.3. Parámetros del ritmo de la actividad locomotora

Periodo en LO

Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); Periodo en LO Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales Prueba Kruskal-Wallis: H (3, N= 43) =8.762447 p =.0326						
Depend.: Periodo	A-S	A-As	B-As	B-S		
	R:25.667	R:14.000	R:22.625	R:26.273		
A-S		0.137113	1.000000	1.000000		
A-As	0.137113		0.794087	0.115239		
B-As	1.000000	0.794087		1.000000		
B-S	1.000000	0.115239	1.000000			

Periodo en OO

Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); Periodo en OO Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales Prueba Kruskal-Wallis: H (3, N= 25) =2.839907 p =.4170						
Depend.: Periodo	A-S	A-As	B-As	B-S		
	R:14.250	R:16.167	R:11.333	R:10.000		
A-S		1.000000	1.000000	1.000000		
A-As	1.000000		1.000000	0.724747		
B-As	1.000000	1.000000		1.000000		
B-S	1.000000	0.724747	1.000000			

Amplitud en LO

Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); Amplitud en LO Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales Prueba Kruskal-Wallis: H (3, N= 44) =17.31919 p =.0006						
Depend.: Amplitud	A-S	A-As	B-As	B-S		
	R:35.083	R:18.250	R:21.750	R:14.667		
A-S		0.007964	0.137745	0.000593		
A-As	0.007964		1.000000	1.000000		
B-As	0.137745	1.000000		1.000000		
B-S	0.000593	1.000000	1.000000			

Amplitud en OO

Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); Amplitud en OO Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales Prueba Kruskal-Wallis: H (3, N= 26) =2.087607 p =.5544						
Depend.: Amplitud	A-S	A-As	B-As	B-S		
	R:16.750	R:12.000	R:12.000	R:12.125		
A-S		1.000000	1.000000	1.000000		
A-As	1.000000		1.000000	1.000000		
B-As	1.000000	1.000000		1.000000		
B-S	1.000000	1.000000	1.000000			

Actividad promedio en LO

	Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); Actividad promedio en LO Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales Prueba Kruskal-Wallis: $H(3, N=44) = 5.043434$ $p = .1686$			
Depend.: Act prom	A-S	A-As	B-As	B-S
	R:27.250	R:23.417	R:24.000	R:15.833
A-S		1.000000	1.000000	0.176851
A-As	1.000000		1.000000	0.888920
B-As	1.000000	1.000000		0.981880
B-S	0.176851	0.888920	0.981880	

Actividad promedio en OO

	Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); Actividad promedio en OO Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales Prueba Kruskal-Wallis: $H(3, N=26) = 2.277371$ $p = .5169$			
Depend.: Act prom	A-S	A-As	B-As	B-S
	R:16.625	R:10.857	R:13.667	R:12.625
A-S		0.870557	1.000000	1.000000
A-As	0.870557		1.000000	1.000000
B-As	1.000000	1.000000		1.000000
B-S	1.000000	1.000000	1.000000	

Inicio de actividad en LO

	Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); Inicio de actividad en LO Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales Prueba Kruskal-Wallis: $H(3, N=42) = 24.25477$ $p = .0000$			
Depend.: Inicio	A-S	A-As	B-As	B-S
	R:13.750	R:31.909	R:31.500	R:12.273
A-S		0.002346	0.009148	1.000000
A-As	0.002346		1.000000	0.001045
B-As	0.009148	1.000000		0.004462
B-S	1.000000	0.001045	0.004462	

Inicio de actividad en OO

	Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); Inicio de actividad en OO Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales Prueba Kruskal-Wallis: $H(3, N=25) = 4.417692$ $p = .2198$			
Depend.: Inicio	A-S	A-As	B-As	B-S
	R:10.250	R:11.333	R:20.000	R:14.375
A-S		1.000000	0.302221	1.000000
A-As	1.000000		0.575078	1.000000
B-As	0.302221	0.575078		1.000000
B-S	1.000000	1.000000	1.000000	

Acrofase en LO

		Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); Acrofase en LO Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales Prueba Kruskal-Wallis: $H(3, N=42) = 23.72293$ $p = .0000$			
Depend.:		A-S	A-As	B-As	B-S
Acrofase		R:12.667	R:31.318	R:32.063	R:13.636
A-S			0.001622	0.003195	1.000000
A-As		0.001622		1.000000	0.004346
B-As		0.003195	1.000000		0.007364
B-S		1.000000	0.004346	0.007364	

Acrofase en OO

		Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); Acrofase en OO Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales Prueba Kruskal-Wallis: $H(3, N=25) = 4.449231$ $p = .2169$			
Depend.:		A-S	A-As	B-As	B-S
Acrofase		R:10.750	R:10.333	R:19.667	R:14.750
A-S			1.000000	0.441150	1.000000
A-As		1.000000		0.437420	1.000000
B-As		0.441150	0.437420		1.000000
B-S		1.000000	1.000000	1.000000	

Horas de actividad α en LO

		Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); α en LO Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales Prueba Kruskal-Wallis: $H(3, N=42) = 3.937194$ $p = .2683$			
Depend.:		A-S	A-As	B-As	B-S
α		R:25.167	R:15.864	R:20.313	R:24.000
A-S			0.415594	1.000000	1.000000
A-As		0.415594		1.000000	0.719098
B-As		1.000000	1.000000		1.000000
B-S		1.000000	0.719098	1.000000	

Horas de actividad α en OO

		Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); α en OO Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales Prueba Kruskal-Wallis: $H(3, N=25) = .0690650$ $p = .9953$			
Depend.:		A-S	A-As	B-As	B-S
α		R:12.438	R:13.250	R:13.333	R:13.250
A-S			1.000000	1.000000	1.000000
A-As		1.000000		1.000000	1.000000
B-As		1.000000	1.000000		1.000000
B-S		1.000000	1.000000	1.000000	

Horas de reposo ρ en LO

Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); ρ en LO				
Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales				
Prueba Kruskal-Wallis: $H(3, N=42) = 1.899992$ $p = .5934$				
Depend.: ρ	A-S	A-As	B-As	B-S
	R:18.917	R:19.500	R:23.313	R:25.000
A-S		1.000000	1.000000	1.000000
A-As	1.000000		1.000000	1.000000
B-As	1.000000	1.000000		1.000000
B-S	1.000000	1.000000	1.000000	

Horas de reposo ρ en OO

Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); ρ en OO				
Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales				
Prueba Kruskal-Wallis: $H(3, N=25) = 3.318007$ $p = .3451$				
Depend.: ρ	A-S	A-As	B-As	B-S
	R:16.813	R:11.583	R:12.333	R:10.500
A-S		1.000000	1.000000	0.517632
A-As	1.000000		1.000000	1.000000
B-As	1.000000	1.000000		1.000000
B-S	0.517632	1.000000	1.000000	

Relación α/ρ en LO

Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); α/ρ en LO				
Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales				
Prueba Kruskal-Wallis: $H(3, N=42) = 1.011929$ $p = .7984$				
Depend.: α/ρ	A-S	A-As	B-As	B-S
	R:24.000	R:19.500	R:19.625	R:22.136
A-S		1.000000	1.000000	1.000000
A-As	1.000000		1.000000	1.000000
B-As	1.000000	1.000000		1.000000
B-S	1.000000	1.000000	1.000000	

Relación α/ρ en OO

Comparaciones múltiples, valores p (2 colas); α/ρ en OO				
Variable independiente (agrupadora): Condiciones experimentales				
Prueba Kruskal-Wallis: $H(3, N=25) = .7812018$ $p = .8540$				
Depend.: α/ρ	A-S	A-As	B-As	B-S
	R:11.125	R:13.667	R:13.667	R:14.125
A-S		1.000000	1.000000	1.000000
A-As	1.000000		1.000000	1.000000
B-As	1.000000	1.000000		1.000000
B-S	1.000000	1.000000	1.000000	

Diferencia de horas entre la acrofase y la alimentación (sólo LO)

variable	Prueba U de Mann-Whitney, Diferencia acrofase-alimentación Por variable "Condiciones experimentales" Valor de prueba es significativo cuando $p < .05000$									
	Sum. Rang. A-S	Sum. Rang. B-S	U	Z	p-valor	Z ajustado	p-valor	N LO1	N LO4	2*1sided exact p
Dif ac-al	148.0000	128.0000	62.00000	0.215410	0.829448	0.215463	0.829406	12	11	0.832752

Diferencia de horas entre la alimentación y el inicio de la actividad (sólo LO)

variable	Prueba U de Mann-Whitney, Diferencia alimentación-inicio de actividad Por variable "Condiciones experimentales" Valor de prueba es significativo cuando $p < .05000$									
	Sum. Rang. A-S	Sum. Rang. B-S	U	Z	p-valor	Z ajustado	p-valor	N LO1	N LO4	2*1sided exact p
Dif al-onset	132.0000	144.0000	54.00000	-0.707776	0.479085	-0.707951	0.478976	12	11	0.486503

2. Comparaciones pareadas

Resultados de los análisis pareados dentro de la misma condición experimental (LO contra OO). Análisis no paramétrico de datos pareados de Wilcoxon (*Wilcoxon Matched Pairs Test*) (STATISTICA ver. 10, StatSoft Inc, 2011). Valores de las celdas en rojo indican diferencias significativas entre LO y OO.

Periodo

Comparación de variables	Prueba pareada de Wilcoxon (periodo) Valores en rojo, prueba significativa al $p < 0.05$			
	N	T	Z	p-valor
A-S LO vs A-S OO	6	4.000000	1.362770	0.172956
A-As LO vs A-As OO	7	8.000000	1.014185	0.310495
B-S LO vs B-S OO	8	11.50000	0.910182	0.362727
B-As LO vs B-As OO	2	1.000000	0.447214	0.654721

Amplitud

Comparación de variables	Prueba pareada de Wilcoxon (periodo) Valores en rojo, prueba significativa al $p < 0.05$			
	N	T	Z	p-valor
A-S LO vs A-S OO	8	0.00	2.520504	0.011719
A-As LO vs A-As OO	7	2.000000	2.028370	0.042523
B-S LO vs B-S OO	8	2.000000	2.240448	0.025063
B-As LO vs B-As OO	2	0.00	1.341641	0.179713

Actividad promedio

Comparación de variables	Prueba pareada de Wilcoxon (periodo)			
	Valores en rojo, prueba significativa al $p < 0.05$			
	N	T	Z	p-valor
A-S LO vs A-S OO	8	0.00	2.520504	0.011719
A-As LO vs A-As OO	7	0.00	2.366432	0.017961
B-S LO vs B-S OO	8	0.00	2.520504	0.011719
B-As LO vs B-As OO	2	1.000000	0.447214	0.654721

Acrofase

Comparación de variables	Prueba pareada de Wilcoxon (periodo)			
	Valores en rojo, prueba significativa al $p < 0.05$			
	N	T	Z	p-valor
A-S LO vs A-S OO	8	17.000000	0.140028	0.888638
A-As LO vs A-As OO	6	5.000000	1.153113	0.248865
B-S LO vs B-S OO	8	6.000000	1.680336	0.092893
B-As LO vs B-As OO	2	1.000000	0.447214	0.654721

Inicio de actividad

Comparación de variables	Prueba pareada de Wilcoxon (periodo)			
	Valores en rojo, prueba significativa al $p < 0.05$			
	N	T	Z	p-valor
A-S LO vs A-S OO	8	18.000000	0.00	1.000000
A-As LO vs A-As OO	6	6.000000	0.943456	0.345448
B-S LO vs B-S OO	8	6.000000	1.680336	0.092893
B-As LO vs B-As OO	2	1.000000	0.447214	0.654721

Horas de actividad α

Comparación de variables	Prueba pareada de Wilcoxon (periodo)			
	Valores en rojo, prueba significativa al $p < 0.05$			
	N	T	Z	p-valor
A-S LO vs A-S OO	8	9.000000	1.260252	0.207579
A-As LO vs A-As OO	6	9.000000	0.314485	0.753153
B-S LO vs B-S OO	8	12.000000	0.840168	0.400815
B-As LO vs B-As OO	2	1.000000	0.447214	0.654721

Horas de reposo ρ

Comparación de variables	Prueba pareada de Wilcoxon (periodo)			
	Valores en rojo, prueba significativa al $p < 0.05$			
	N	T	Z	p-valor
A-S LO vs A-S OO	8	0.00	2.520504	0.011719
A-As LO vs A-As OO	6	8.000000	0.524142	0.600180
B-S LO vs B-S OO	8	16.00000	0.280056	0.779435
B-As LO vs B-As OO	2	1.000000	0.447214	0.654721

Relación α/ρ

Comparación de variables	Prueba pareada de Wilcoxon (periodo)			
	Valores en rojo, prueba significativa al $p < 0.05$			
	N	T	Z	p-valor
A-S LO vs A-S OO	8	0.00	2.520504	0.011719
A-As LO vs A-As OO	5	5.000000	0.674200	0.500185
B-S LO vs B-S OO	8	13.00000	0.700140	0.483840
B-As LO vs B-As OO	2	1.000000	0.447214	0.654721