



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
ECOLOGÍA**

**INFLUENCIA DE FOTOPERIODOS Y TERMOPERIODOS EN EL CONTROL
CIRCADIANO DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ DE LA VÍBORA *Crotalus molossus***

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

ÁNGEL BERNARDO VILLARREAL MEDINA

**TUTOR PRINCIPAL: DR. VÍCTOR HUGO REYNOSO ROSALES
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. PILAR DURÁN HERNÁNDEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DRA. ELSA ESCAMILLA CHIMAL
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2021



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

OFICIO CPCB/018/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de noviembre de 2020, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en el campo de conocimiento de ECOLOGÍA del alumno VILLARREAL MEDINA ÁNGEL BERNARDO con número de cuenta 305022901 con la tesis titulada "INFLUENCIA DE FOTOPERIODOS Y TERMOPERIODOS EN EL CONTROL CIRCADIANO DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ DE LA VIBORA *CROTALUS MOLOSSUS*", realizada bajo la dirección del DR. VÍCTOR HUGO REYNOSO ROSALES, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES
Vocal: DR. ALONSO MARTÍNEZ CANABAL
Secretario: DRA. PILAR DURÁN HERNÁNDEZ
Suplente: DRA. LORENA AGUILAR ARNAL
Suplente: DRA. GUILLERMINA ALCARÁZ ZUBELDÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 08 de enero de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente al Instituto de Biología.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada de 2018 a 2020, con número CVU 919762.

Este proyecto fue parcialmente financiado por el Buró de Investigaciones y Soluciones Biológicas, A.C. (ISBio).

Este proyecto fue realizado con el permiso especial de colecta autorizado por SEMARNAT, Número de Oficio: SGPA/DGVS/013219/18, del día 17 de diciembre de 2018 al Dr. Víctor Hugo Reynoso Rosales, asesor y responsable de esta investigación. Las técnicas de colecta y manipulación empleadas fueron acreditadas por la SEMARNAT en este mismo permiso.

Al Dr. Jorge Nieto Sotelo, entonces jefe del Jardín Botánico por permitir realizar tanto el muestro de organismos como la fase 1 de la experimentación y a la Dra. Silke Cram Heydrich por permitir el acceso a la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (Proyecto 465).

Al Dr. Víctor Hugo Reynoso Rosales por permitir el uso del Bioterio para la Experimentación Zoológica del Instituto de Biología de la UNAM.

A mi tutor principal, el Dr. Víctor Hugo Reynoso Rosales y los miembros de mi comité tutor, la Dra. Pilar Durán Hernández y la Dra. Elsa Escamilla Chimal.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mi madre Cecilia, por siempre estar conmigo y apoyarme en todo.

A mi Padre Juan Francisco, por apoyarme durante mis estudios y desarrollo, quién me enseñó que hay que esforzarse y trabajar duro para obtener lo que uno quiere.

A mi Comité tutor, mi director de tesis, el Dr. Víctor Hugo Reynoso Rosales, por su apoyo y amistad incondicionales, por facilitar el espacio para realizar el trabajo y por su patrocinio. La Dra. Pilar Durán Hernández por su orientación, paciencia y siempre tener sus puertas abiertas. La Dra. Elsa Escamilla Chimal por su gentileza, buena disposición y asesoría durante el proyecto.

A los miembros de mi jurado, la Dra. Carolina Escobar Briones, el Dr. Alonso Martínez Canabal, la Dra. Pilar Durán Hernández, la Dra. Lorena Aguilar Arnal, y la Dra. Guillermina Alcaráz Zubeldía, por las revisiones y comentarios a este proyecto.

Al Biol. Guillermo Gil Alarcón por su ayuda en la recolección de los organismos de estudio utilizados en este proyecto y apoyo para su manejo.

A Grecia, por su apoyo incondicional en las buenas y en las malas. Por ayudarme en el análisis de datos y en pensar en el mejor método para el proyecto. Por alentarme en la continuación de mis estudios.

Al Dr. Omar Hernández Ordóñez, por su ayuda con el procesamiento de los datos de los data-loggers.

Al Biol. Martín Fuentes Cano por el apoyo con el análisis del trabajo y con el alimento para los organismos de estudio.

Índice

1	RESUMEN.....	1
2	ABSTRACT.....	2
3	INTRODUCCIÓN	3
3.1	Relojes y ritmos biológicos	3
3.1.1	Características de los ritmos circadianos	5
3.2	Organización general del sistema circadiano en reptiles.....	8
3.2.1	Factores determinantes para los ritmos biológicos, la sincronización por luz y por temperatura.....	10
3.2.2	¿Cuál estímulo sincroniza más eficientemente la actividad de los reptiles?.....	12
3.2.3	Sistema circadiano en serpientes.....	14
3.2.4	Estudios realizados en serpientes con ciclos de luz y temperatura	16
3.3	Biología general de la víbora <i>Crotalus molossus</i>	19
3.3.1	Conducta.....	21
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
5	JUSTIFICACIÓN.....	27
6	OBJETIVOS	29
6.1	Objetivo General	29
6.2	Objetivos particulares	29
7	HIPÓTESIS.....	30
7.1	Predicciones	30
8	MATERIALES Y MÉTODO	31
8.1	Obtención y mantenimiento de los organismos de estudio	31
8.2	Protocolo experimental de ritmos biológicos.....	31
8.2.1	Fase 1. Condición semicautiverio con condiciones naturales de luz, temperatura y humedad.32	
8.2.2	Fase 2. Condiciones controladas de luz, temperatura y humedad.	34
8.3	Análisis de datos y estadístico	38
8.3.1	Obtención de datos	38
8.3.2	Análisis estadístico	39
8.4	Declaración de ética	40
9	RESULTADOS.....	42

9.1	Fase 1: Condición semicautiverio	42
9.1.1	Comportamiento de las variables ambientales durante el experimento.	42
9.1.2	Actividad de las víboras.....	45
9.2	Fase 2, etapa 1: Ritmo endógeno y la luz como sincronizador: L/O 18:6, O/O, L/O 12:12.	49
9.3	Fase 2, etapa 2: La temperatura y la luz como sincronizadores.	52
9.3.1	Sincronización a la termofase	52
9.3.2	Sincronización a la fotofase	53
9.3.3	Condición 4 (Conflicto)	55
9.4	Ecdisis en varias serpientes durante los experimentos	59
10	DISCUSIÓN.....	62
10.1	Ritmo en semicautiverio	62
10.2	Ritmo en cautiverio	65
10.3	Efectos del proceso de ecdisis sobre la actividad en <i>Crotalus molossus</i>	72
11	CONCLUSIONES.....	74
12	ANEXOS.....	76
13	REFERENCIAS	79

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la organización del sistema circadiano en vertebrados.....	3
Figura 2: Parámetros que definen un ritmo biológico ajustado a una sinusoidal.....	7
Figura 3. Molde interno de la bóveda craneal de <i>Crotalus atrox</i> obtenido mediante tomografía computarizada.....	15
Figura 4. Ejemplar adulto hembra de <i>Crotalus molossus nigrescens</i>	20
Figura 5. Distribución geográfica del grupo <i>Crotalus molossus</i> (Modificado de Anderson y Greenbaum, 2012)	21
Figura 6. Encierros de semicautiverio en el Jardín Botánico (UNAM)	33
Figura 7. Encierros individuales de cautiverio realizados con madera utilizados para videograbación	35
Figura 8. Temperatura, humedad e irradiancia promedio diarias que se presentaron durante la experimentación en los encierros de semicautiverio en los dos grupos experimentales de víboras.....	43
Figura 9. Regresión lineal entre temperatura y humedad registradas en los encierros de semicautiverio en los dos grupos experimentales	44
Figura 10. Curva promedio de actividad en semicautiverio de los dos grupos de víboras en segundos de movimiento.....	45
Figura 11. Periodos del ritmo y actividad promedio de las víboras en todo el experimento	46
Figura 12. Actogramas de las nueve víboras en condición de semicautiverio.....	47
Figura 13. Regresión lineal entre temperatura, humedad y la actividad de las víboras en semicautiverio.....	48
Figura 14. Relación de fase de inicio y fin de actividad en semicautiverio	49
Figura 15. Relación de fase entre Ai – LOFF y Af - LON durante la Fase 2	50
Figura 16. Actogramas en doble gráfica de las ocho víboras en la fase 2, etapa 1	51

Figura 17. Relación de fase entre el Ai y Af con TON y TOFF	55
Figura 18. Actogramas en doble gráfica de las ocho víboras en la fase 2, etapa 2	57
Figura 19. Actogramas en doble gráfica de las ocho víboras en la condición 4	59
Figura 20. Regresión lineal entre la actividad registrada de las víboras (en segundos) en condición semicautiverio y la irradiancia en los encierros de semicautiverio	78

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Víboras capturadas separadas por grupo, estadio y sexo.....	31
Cuadro 2. Protocolo de registro de actividad por individuo colectado	32
Cuadro 3. Periodos de actividad en horas de las víboras en los experimentos (alpha= 0.05).....	77
Cuadro 4. Promedio diario de alpha en horas de las víboras en los experimentos	79

Índice de abreviaturas

Ai	Inicio de Actividad.
Af	Fin de Actividad.
L/O	Luz y Oscuridad.
O/O	Oscuridad constante, libre corrimiento.
L/O 18:6	Luz durante 18 horas y oscuridad durante 6 horas.
L/O 12:12	Luz durante 12 horas y oscuridad durante 12 horas.
TON	Inicio de la termofase.
TOFF	Fin de la termofase.
LON	Inicio de la fotofase.
LOFF	Fin de la fotofase.
Ai – LON	Tiempo que transcurre entre el inicio de la actividad y el inicio del fotoperiodo.
Ai – TON	Tiempo que transcurre entre el inicio de la actividad y el inicio del termoperiodo.
Ai – LOFF	Tiempo que transcurre entre el inicio de la actividad y el fin del fotoperiodo.
Ai - TOFF	Tiempo que transcurre entre el inicio de la actividad y el fin del termoperiodo.
Af – LON	Tiempo que transcurre entre el fin de la actividad y el inicio del fotoperiodo.
Af – TON	Tiempo que transcurre entre el fin de la actividad y el inicio del termoperiodo.
Af – LOFF	Tiempo que transcurre entre el fin de la actividad y el fin del fotoperiodo.
Af - TOFF	Tiempo que transcurre entre el fin de la actividad y el fin del termoperiodo.

1 RESUMEN

La víbora de cascabel de cola negra (*Crotalus molossus*) ha sido descrita como una serpiente diurna, nocturna y crepuscular. Por su condición poiquiloterma, se piensa que su actividad está asociada principalmente a la temperatura ambiental y no a otros factores, como la luz. Los ciclos de temperatura y de luz y oscuridad (L/O) son considerados como los sincronizadores más importantes para los ritmos circadianos de la actividad locomotriz. Se investigó la capacidad de sincronización de ciclos de L/O y de temperatura (30 °C/20 °C) en la actividad locomotriz de *C. molossus*. El estudio se realizó en dos fases. En la fase 1, las víboras se expusieron a condiciones naturales en encierros en semicautiverio resultando que siete de nueve individuos presentaron actividad diurna iniciándola después de medio día. En la fase 2, se mantuvieron en condiciones controladas modificando ciclos de L/O y de temperatura. Al presentar ciclos de L/O a temperatura constante, el ritmo fue sincronizado por la luz con actividad durante la escotofase y continuó en libre curso por lo que se confirma circadiano. Al exponer a las serpientes a ciclos de temperatura en oscuridad constante, la actividad fue sincronizada por el ciclo térmico y se presentó durante la termofase (30 °C). Al presentar ciclos de L/O con la escotofase durante la termofase, todas las víboras se sincronizaron al ciclo de L/O y realizaron su actividad durante la escotofase. Finalmente, cuando se colocaron en ciclos de L/O y ciclos de temperatura fuera de fase uno con el otro, la actividad se volvió bimodal en tres de ocho víboras, mientras que en las otras se distingue una sincronización mediada por luz con movimiento durante la escotofase. Los resultados demuestran que los ciclos de L/O y de temperatura son importantes para sincronizar los ritmos de actividad locomotriz de *C. molossus* y la interacción entre ambos ciclos sincroniza con mayor precisión este ritmo. Así también, los ciclos de temperatura sincronizan adecuadamente la actividad cuando las señales fóticas están ausentes. De mayor importancia, parece que la luz es el sincronizador de mayor prioridad para los ritmos de actividad, dado un intervalo óptimo de temperatura.

2 ABSTRACT

The black-tailed rattlesnake (*Crotalus molossus*) has been reported as a diurnal, nocturnal and crepuscular snake. Because of its poikilotherm condition, it is believed that its activity is associated to ambient temperature rather than other factors, such as light. In relation to such, light-dark (L/D) and temperature cycles are considered the most important synchronizers of locomotor activity of circadian rhythms. Here it was examined the relative importance of 24 h LD and temperature (30 °C/20 °C) cycles in entraining the circadian locomotor activity rhythm in *C. molossus*. The study consisted in two phases. In phase 1, snakes were exposed to natural conditions in semi-captive enclosures, resulting in that seven out of nine individuals presented diurnal activity starting after noon. In phase 2 snakes were maintained under controlled conditions and L/D and temperature cycles were modified. We found that the activity rhythm was synchronized by light when exposed to L/D cycles with constant temperature showing activity during scotophase. Moreover, it was confirmed that the rhythm was truly circadian because it free ran in constant conditions. In addition, when exposing the snakes to temperature cycles in constant darkness, the activity was synchronized by the thermal cycle and occurred during the thermophase (30 °C). When snakes were subjected to L/D cycles with the scotophase during the thermophase, all snakes were synchronized to the L/D cycle and performed their activity during the scotophase. Finally, when snakes were exposed to L/D and thermo cycles out of phase with each other the activity became bimodal in three of eight snakes, while the others showed a light-mediated entrainment with activity during the scotophase. In conclusion, these results demonstrate that both L/D and temperature cycles are important for entraining circadian locomotor activity rhythms of *C. molossus* and an interaction between these most accurately synchronizes this rhythm. Additionally, temperature cycles are important for entraining circadian locomotor activity rhythms when photic cues are absent. Most importantly, it appears that light is the highest priority synchronizer for activity rhythms, given an optimal temperature range.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Relojes y ritmos biológicos

Debido al constante cambio del ambiente, los organismos han desarrollado mecanismos para poder medir y anticiparse a las variaciones cíclicas predecibles. Dentro de estos mecanismos, los relojes biológicos han sido los más ampliamente estudiados (Golombek y Rosenstein, 2010) y se pueden definir como sistemas celulares capaces de generar un orden temporal en las actividades de los organismos (Daan, 2010). Los relojes biológicos son también llamados marcapasos y generan una representación interna del tiempo externo. En la mayoría de los organismos, este sistema se compone de un marcapasos central y osciladores periféricos (Figura 1) (Pittendrigh, 1960). El marcapasos central en los mamíferos y en la mayoría de los vertebrados es el núcleo supraquiasmático (NSQ) localizado en el hipotálamo (Klein *et al.*, 1991; Watanabe *et al.*, 2012). Sin embargo, en algunos peces, anfibios, reptiles y aves esta función la desempeña ya sea la glándula pineal o alguna otra estructura todavía no descrita (Underwood, 1990; Tosini *et al.*, 2001).

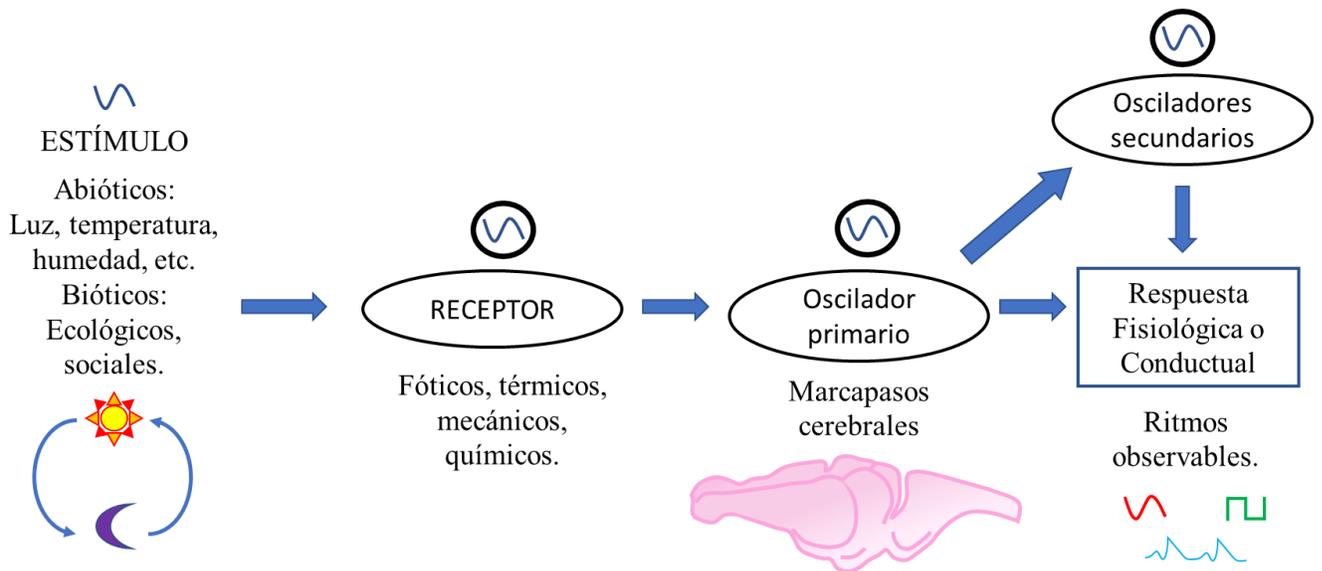


Figura 1. Esquema de la organización del sistema circadiano en vertebrados. Las señales son captadas por sistemas sensoriales que envían la información a un marcapasos primario, el cual impone fase y periodo a osciladores periféricos capaces de generar ritmos biológicos observables de muy diversa índole.

Los relojes biológicos generan ritmos biológicos para predecir y anticiparse a las condiciones ambientales. Estos se definen como una respuesta fisiológica o conductual que presenta cierta periodicidad (Sharma, 2003). Los ritmos biológicos más estudiados son los circadianos (*circa*: alrededor de, y *dies*: día) con duración aproximada de 24 horas y se consideran de origen endógeno ya que persisten sin estímulos externos (Pittendrigh, 1960). Al mantener a un organismo en condiciones constantes, el ritmo se manifiesta con su periodo endógeno (τ), denominado como una oscilación espontánea en libre curso (Sheeba, 1999).

La hormona melatonina, considerada como el principal mensajero neuroquímico para los ritmos circadianos, transduce la información fotoperiódica y sincroniza los ritmos circadianos en el organismo mediante la activación de receptores de melatonina (Dubocovich *et al.*, 1995). Esta hormona se sintetiza principalmente en la glándula pineal y en menor medida en las retinas, en la glándula de Harder y en el ojo parietal de los reptiles (Tosini *et al.*, 2001; Firth *et al.*, 2010). La síntesis y secreción de esta hormona aumenta durante el periodo oscuro del día y se mantiene a un nivel bajo durante las horas de luz (Underwood, 1990). Este ritmo hormonal funciona como una señal que indica el cambio en iluminación, tanto diaria como estacional, para la sincronización y expresión de varios ritmos biológicos (Firth *et al.*, 1999). Se ha reportado que en vertebrados poiquiloterms el ritmo de melatonina es sensitivo a cambios térmicos, indicándole al sistema sobre la temperatura ambiental, lo que dificulta el entendimiento de como los ritmos de melatonina afectan la homeostasis diaria y estacional de estos organismos (Firth *et al.*, 1989, 1991).

Los ritmos biológicos se clasifican de acuerdo con su periodo (la duración de un ciclo completo) y frecuencia (número de veces que ocurre el fenómeno en un intervalo de tiempo). Tomando como referencia los circadianos, cuya frecuencia es una vez cada 24 horas, se definen los ultradianos, con una frecuencia mayor a los circadianos y ocurren más de una vez durante un día (e.g., respiración, actividad cardiaca) y los infradianos, con menor frecuencia que los

circadianos y requieren más de un día para su repetición (e.g. migraciones, reproducción, hibernación) (Sharma, 2003).

3.1.1 Características de los ritmos circadianos

La principal característica de los ritmos circadianos es la conservación de un periodo intrínseco cercano a 24 horas (Pittendrigh, 1960). Otra característica de gran importancia es la independencia a cambios en varios factores externos, como temperatura, nutrición y pH, dentro de límites fisiológicos tolerables. La propiedad de ser independiente a cambios en la temperatura se le conoce como compensación de temperatura y ha sido de las más estudiadas (Rensing y Ruoff, 2002). Finalmente, se pueden ajustar, mediante estímulos, para oscilar con un periodo de exactamente 24 horas, una propiedad de los relojes circadianos conocida como sincronización (Paranjpe y Sharma, 2005). Si no se cumplen con estos criterios, el ritmo no es considerado circadiano y entonces se le denomina ritmo diario, el cual es la respuesta a señales ambientales; es decir, un ritmo exógeno (Pittendrigh y Minis, 1964).

La sincronización es producida por señales externas, denominadas *zeitgeber* (del alemán, *zeit*: tiempo y *geber*: dador). De estas señales, la más importante para los mamíferos y que también se asume para otros organismos, es la luz, en el ciclo día y noche generado por la rotación de la Tierra (Aschoff, 1981; Golombek y Rosenstein, 2010). Sin embargo, existen otros factores a los que se sincronizan los ritmos y estos pueden ser abióticos, como los ciclos geofísicos, temperatura o humedad; y bióticos como disponibilidad de comida, oportunidad de apareamiento u organización social. Es importante mencionar que esta sincronización no solo permite predecir y anticiparse a los eventos periódicos, sino también provee de mecanismos para ajustar la respuesta (Helm *et al.*, 2017).

Un proceso parecido a la sincronización es el enmascaramiento, el cual consta de una ruta que no involucra un marcapasos (Mrosovsky, 1999); no obstante, puede complementar el control del sistema circadiano (Redlin, 2001). Un factor de enmascaramiento se puede definir como aquel que afecta directa e inmediatamente la fisiología y el comportamiento de un organismo (Redlin, 2001), es una aparente sincronización, ya que al retirar el estímulo sincronizador el ritmo en libre curso se restablece con la fase del reloj endógeno. Una de las principales características de este proceso es que, si bien el ritmo expresado por el efector ajusta su fase al sincronizador, este último no afecta el periodo ni la fase del reloj biológico. Es interesante mencionar que cualquier estímulo puede enmascarar, incluida la luz (Mrosovsky, 1999).

En la naturaleza, los organismos presentan ritmos de actividad (α) y reposo (ρ), mostrando actividad diurna, nocturna, crepuscular o siendo arrítmicos (Floessner y Hut, 2017). Sin embargo, estos ritmos de actividad pueden modificarse dependiendo de las condiciones ambientales (Hut *et al.*, 2012). Debido a esto, se han definido escalas de tiempo y marcadores específicos para su análisis. Por ejemplo, cuando un organismo se encuentra en sincronización, el periodo de actividad del ritmo es igual al periodo del ciclo del zeitgeber (T). El eje temporal de este ciclo T se puede dividir en 24 horas zeitgeber (ZT0 – ZT24) considerando el inicio del estímulo (e.g. encendido de la luz) como la hora zeitgeber 0 (ZT0). Sin embargo, en condiciones constantes esta escala no se puede utilizar, por lo que se ha implementado una basada en el ritmo en libre curso, denominada escala del tiempo circadiano (CT). La escala del ritmo circadiano se puede definir como una unidad de tiempo estandarizada de 24 horas, basada en el periodo endógeno de un organismo en libre curso sin referencia a ningún zeitgeber y representa una estimación del tiempo subjetivo del organismo (Vitaletta *et al.*, 2001). En esta escala, CT0 marca el inicio del día subjetivo, que es el inicio de actividad en animales diurnos y CT12 el inicio de la noche subjetiva, que es el inicio de actividad en animales nocturnos.

Los ritmos biológicos se observan en toda la escala filogenética, en procariotas y eucariotas desde unicelulares hasta multicelulares (Paranjpe y Sharma, 2005). Los parámetros que definen un ritmo se pueden analizar mediante una función sinusoidal y son el periodo, la frecuencia, la amplitud, el estimador de línea media estadística del ritmo (MESOR, por sus siglas en inglés), la fase, la acrofase, la batifase, el marcador de fase y la relación de fase (Figura 2).

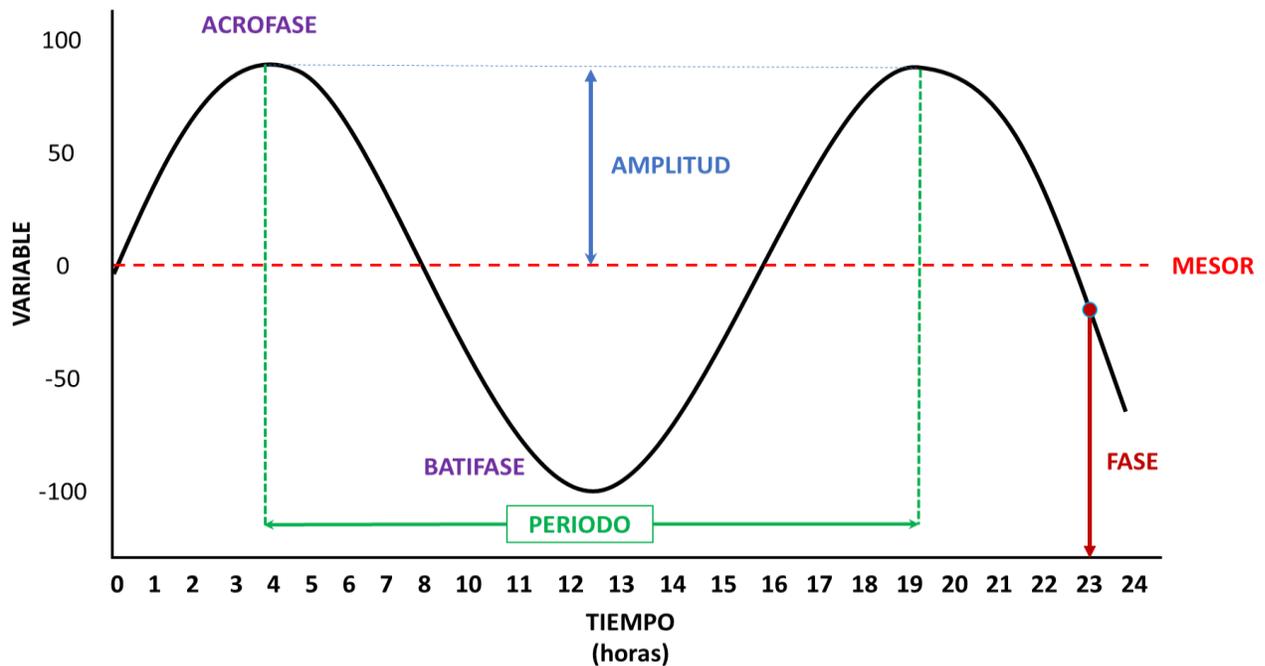


Figura 2: Parámetros que definen un ritmo biológico ajustado a una sinusoidal.

El periodo es el intervalo de tiempo entre dos acontecimientos idénticos; esto es, la duración de un ciclo completo. La frecuencia es el número de veces que ocurre el fenómeno en un intervalo de tiempo. La amplitud es la diferencia entre el valor máximo (o mínimo) y el valor medio de una oscilación. El MESOR es una media ajustada a ritmos que difiere de la media aritmética cuando los datos no son equidistantes y/o no cubren un número entero de ciclos. La fase es el momento en que ocurre un hecho característico dentro del ciclo en estudio. La acrofase es el valor máximo de

la variable a lo largo de un periodo y, la batifase el valor mínimo de la variable a lo largo de un periodo. El marcador de fase es el evento característico seleccionado para estimar la fase y la relación de fase, la diferencia en la comparación entre dos ritmos distintos.

3.2 Organización general del sistema circadiano en reptiles

El sistema circadiano de los reptiles está compuesto por varias entradas fóticas y múltiples osciladores autónomos que regulan diversas salidas dentro del organismo y cuya importancia varía dependiendo de la especie y de la estación (Underwood, 1983; Tosini y Menaker, 1998). Se consideran cuatro estructuras como los principales marcapasos del sistema: el núcleo supraquiasmático o su región homóloga al hipotálamo de los mamíferos, la glándula pineal o *epiphysis cerebri*, el ojo parietal y la retina. Éstas se encuentran conectadas mediante señalización endócrina y neural (Underwood, 2000; Tosini *et al.*, 2001; Ellis *et al.*, 2007).

Se ha comprobado que lesiones electrolíticas en el NSQ elimina casi todos los ritmos circadianos (Tosini *et al.*, 2001). Sin embargo, en reptiles solo se ha demostrado la participación del NSQ en ritmos circadianos en las lagartijas *Dipsosaurus dorsalis* y *Podarcis siculus* debido a que su lesión elimina los ritmos de actividad locomotriz (Janik *et al.*, 1990; Minutini *et al.*, 1995).

La glándula pineal se encuentra presente en todas las especies de reptiles con excepción del orden Crocodylia y es un componente central en la regulación circadiana (Underwood, 1990). Esta glándula contiene células sensibles a la luz, excepto en el suborden Ophidia (Quay, 1979). Diversos estudios demuestran que la lesión a la glándula pineal elimina o modifica varios ritmos en reptiles (Janik *et al.*, 1990; Innocenti *et al.*, 1996; Tosini y Menaker, 1998; Miranda-Anaya *et al.*, 2000). Sin embargo, en otras especies como *Sceloporus occidentalis* y *Dipsosaurus dorsalis*, el ritmo de actividad locomotriz persiste después de su extirpación quirúrgica o pinealectomía (Underwood,

1981; Janik *et al.*, 1994). Esta glándula es considerada como un transductor foto-termoendócrino ya que le informa al organismo de las variaciones ambientales de luz y temperatura, mediado por vía de la hormona melatonina (Tosini *et al.*, 2001).

El ojo parietal, ubicado en la parte superior del cráneo en un foramen, entre los huesos parietales, se encuentra en algunas especies de lagartijas y en el tuátara (*Sphenodon* spp.). Está compuesto por una lente, una córnea y una retina simple con fotorreceptores y células ganglionares. El nervio del ojo parietal inerva varias áreas del cerebro, pero no existen proyecciones a la parte visual. Esta estructura parece estar involucrada en varias funciones fisiológicas en lagartijas como termorregulación, reproducción y orientación (Tosini *et al.*, 2001).

Como última estructura asociada al sistema circadiano se encuentran las retinas, órganos que comparten casi todos los vertebrados (Lamb *et al.*, 2007). Las retinas de los ojos laterales contienen osciladores circadianos autosostenidos que producen melatonina y varios estudios demuestran que su remoción puede afectar ritmos de comportamiento o fisiológicos en reptiles (Underwood, 1981; Janik *et al.*, 1990; Foà, 1991).

La ruta que siguen los estímulos lumínicos desde las retinas al NSQ y luego a la glándula pineal, ha sido muy estudiada en mamíferos, pero en otros organismos no está tan bien definida. En mamíferos, las retinas se conectan con el NSQ por medio de proyecciones conocidas como tracto o eje retino-hipotalámico. Este tipo de proyecciones se han encontrado en algunas especies de lagartijas como *Xantusia vigilis*, *Tupinambis nigropunctatus* y *P. siculus*, (Butler, 1974; Ebbesson y Karten, 1981; Korf y Wagner, 1981); sin embargo, en otras especies como *Iguana iguana*, *Anolis carolinensis* y *Gekko gekko* no se han registrado (Butler y Northcutt, 1971; Northcutt y Butler, 1974). Asimismo, en *Crotalus viridis*, *Caiman crocodilus* y *Crocodylus niloticus* se han encontrado proyecciones retinales que inervan el NSQ demostrando que en serpientes y cocodrilos este eje puede existir (Schroeder, 1981, Derobert *et al.*, 1999). Estas

investigaciones sugieren que tanto el NSQ como las proyecciones retinales de varios reptiles son homólogas al de roedores y juegan un papel importante en el sistema circadiano. Sin embargo, no se puede asegurar que los eferentes retinianos en todos los reptiles inerven el NSQ. Schroeder (1981) menciona que, aunque en su estudio con *C. viridis* demostró la existencia de estos eferentes, en otras serpientes no ha quedado claro si las fibras terminan en el NSQ, o simplemente lo atraviesan (Northcutt y Butler, 1974).

3.2.1 Factores determinantes para los ritmos biológicos, la sincronización por luz y por temperatura

Entre las señales ambientales, la luz y la temperatura son los zeitgebers con mayor prioridad para la sincronización de los ritmos circadianos (Firth *et al.*, 1999). Ambos factores presentan ciclos diarios y estacionales y actúan sobre marcapasos endógenos circadianos que controlan ya sea la actividad locomotriz o la actividad de termorregulación (Innocenti *et al.*, 1993; Ellis *et al.*, 2007; Tosini y Menaker, 1995). Se especula que el marcapasos es el mismo para ambos ritmos (Ellis *et al.*, 2008). De la misma manera, se ha comprobado que la intensidad de la luz es importante para la regulación de los periodos en libre curso en muchas especies de animales. Esto último, conocido como Regla de Aschoff, indica que el periodo del ritmo endógeno disminuye en animales diurnos y aumenta en animales nocturnos cuando son expuestos a luz constante; y que, al aumentar la intensidad de la luz, el tiempo de actividad (α) incrementa en contraste con el tiempo de reposo (ρ , rho) en animales diurnos y disminuye en animales nocturnos (Aschoff, 1981). Es importante mencionar que estas reglas no se cumplen en todos los organismos.

La capacidad de sincronización diaria a ciclos fóticos y térmicos en reptiles se fundamenta en estudios realizados principalmente en lagartijas (Innocenti *et al.*, 1993; Rensing y Ruoff, 2002;

Ellis *et al.*, 2006, 2007). Underwood y Menaker (1970) comprobaron que ciclos fóticos sincronizan el ritmo de actividad locomotriz en la lagartija *Sceloporus olivaceus* incluso al removerle los ojos. En el gecko *Gekko japonicus* se demostró que la actividad es sincronizada por luz y la amplitud del ritmo aumentaba al incrementar la temperatura (Tawa *et al.*, 2014). Incluso en anfisbénidos (*Amphisbaenia manni* y *A. gonavensis*) se ha demostrado que ciclos de luz sincronizan la actividad locomotriz, presentando actividad nocturna (Thomas y Thomas, 1978). Respecto a ciclos de temperatura, en la lagartija *Uta stansburiana*, se comprobó que ciclos térmicos son un sincronizador de mayor prioridad que ciclos de luz (Evans, 1966).

La amplitud de los ciclos térmicos es un factor importante para la sincronización de los ritmos de actividad. Se ha comprobado que la amplitud necesaria de ciclos térmicos para la sincronización de organismos poiquilotermos es menor que la requerida para organismos endotérmicos (Ellis *et al.*, 2009). Ciclos térmicos con amplitud de 0.9°C sincronizaron la actividad de la lagartija *Lacerta sicula* (*Podarcis siculus*) (Hoffman, 1968), mientras que se necesitó de una amplitud de 6 - 12 °C para la ardilla *Ammospermophilus leucurus* (Pohl, 1998). Estudios en otros ectotermos, como el pez cebra (*Danio rerio*), han demostrado que, dentro de una misma especie, algunos individuos se sincronizan a ciclos de luz y oscuridad, mientras que otros lo hacen a ciclos térmicos (López-Olmeda *et al.*, 2006).

Estudios con ciclos de luz y de temperatura demostraron que ambos sincronizan los ritmos de melatonina en las lagartijas *Anolis carolinensis*, *Tiliqua rugosa*, *Takydromus tachydromoides* y *T. smaragdinus* y en el gecko *Christinus marmoratus* (Underwood, 1985; Moyer *et al.*, 1997; Firth *et al.*, 1999; Oishi *et al.*, 2004). En la tortuga *Testudo hermanni* se comprobó que la temperatura es más importante que la luz para la expresión rítmica de la melatonina (Vivien-Roels y Arendt, 1983). Aunado a esto, se ha demostrado en reptiles que, debido al sistema de compensación de

temperatura, los ritmos circadianos se mantienen dentro de un amplio intervalo de temperaturas ambientales (Rensing y Ruoff, 2002; Oishi *et al.*, 2004).

Varios estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la amplitud de los ritmos de melatonina pineal sincronizados por luz aumenta cuando se agrega un termociclo; es decir, que la acción sinérgica de ambos sincronizadores refuerza los ritmos (Firth *et al.*, 1979, 1991, 1999; Firth y Kennaway, 1989). Así mismo, se sabe que las mayores amplitudes coinciden con la temperatura preferida o seleccionada por las especies (Firth *et al.*, 1989).

3.2.2 ¿Cuál estímulo sincroniza más eficientemente la actividad de los reptiles?

A pesar de que se ha demostrado que los ciclos fóticos y térmicos sincronizan la actividad locomotriz de los reptiles, el sincronizador de mayor prioridad en la exposición a ambos factores en fases opuestas (e.g., fase luminosa fría y fase oscura cálida) o fuera de fase, solo se ha examinado en cuatro estudios (Evans, 1966; Lee, 1974; Graham y Hutchison, 1978; Ellis *et al.*, 2009) en la tortuga dulceacuícola *Chrysemys picta*, de amplia distribución en Estados Unidos, en las lagartijas *Uta stansburiana*, *Xantusia henshawi* y *Coleonyx variegatus*, de EUA y norte de México; y en *Tiliqua rugosa*, un scincido australiano. Un estudio con la lagartija europea *Podarcis siculus* analizó la capacidad de los ciclos térmicos para sincronizar su actividad, sin embargo, dejó a un lado el cómo afectan ambos sincronizadores (Foà y Bertolucci, 2001). Las temperaturas mínimas y máximas utilizadas en los ciclos térmicos en los trabajos anteriores fueron los siguientes: En *C. variegatus* y *U. stansburiana* de 22 a 27 °C y de 22 a 33 °C para ambos, en *X. henshawi* de 22 a 34 °C, en *C. picta* de 15 a 25 °C, en *T. rugosa* de 15 a 33 °C y de 20 a 30 °C y en *P. siculus* de 27 a 30 °C y de 28.3 a 30 °C (Evans, 1966; Lee, 1974; Graham y Hutchison, 1978; Foà y Bertolucci, 2001; Ellis *et al.*, 2009). En los cinco primeros trabajos se confirmó que los ciclos térmicos son un

sincronizador importante para la actividad locomotriz; sin embargo, el diseño experimental en tres experimentos no permite discernir si se trata de una sincronización o de un enmascaramiento.

Sin embargo, los resultados de estos trabajos son discordantes. Por ejemplo, *C. variegatus* se sincronizó por la fase oscura del fotoperiodo, mostrando actividad únicamente durante la escotofase (Evans, 1966); mientras que *X. henshawi* expresó un ritmo bimodal, con un componente asociado al fotoperiodo y otro al termoperiodo, con actividad diurna (Lee, 1974). Es decir, *X. henshawi* presentó dos fases de actividad separadas en el tiempo. *P. siculus* mantuvo un ritmo bimodal en condiciones constantes, no necesitando de ambos sincronizadores, y este patrón se asocia a la época del año (Foà y Bertolucci, 2001). En *C. picta*, al igual que en *X. henshawi*, se hipotetizó una interacción entre los dos sincronizadores, asociado a un sistema de dos osciladores (Pittendrigh, 1960) en el que un oscilador se sincroniza por el termoperiodo y otro por el fotoperiodo, puesto que el ritmo de actividad pierde sincronía con el termoperiodo, “brincando” de fase y limitando su actividad a la fase luminosa. En el único organismo que se comprobó una sincronización de la actividad a ciclos térmicos fue en *U. stansburiana* (Evans, 1966). En el trabajo más actual, de mayor robustez, Ellis *et al.* (2009) encontraron que los ciclos térmicos en *T. rugosa* sincronizan los ritmos de actividad en oscuridad constante, inclusive cuando las señales fóticas son conflictivas. Los resultados de estos estudios indican que la luz es posiblemente el sincronizador con mayor influencia sobre los ritmos de actividad; sin embargo, concluyen que la actividad locomotriz es el resultado de la interacción entre ambos sincronizadores.

De esta manera, en todos los trabajos se observa que la interacción entre ambos sincronizadores aumenta la amplitud del ritmo y que el estar fuera de fase tiene varias posibilidades ya sea eliminando el ritmo, disminuyendo la amplitud o “brincando” de fase para estar sincronizado al otro zeitgeber (Lee, 1974; Graham y Hutchison, 1978). Sin embargo, no existe un consenso sobre cuál sincronizador es el de mayor importancia para los ritmos de actividad entre los reptiles.

Recordemos que estas conclusiones están restringidas al estudio de únicamente cuatro especies de lagartijas y una de tortuga, dejando a los demás órdenes en el olvido.

3.2.3 Sistema circadiano en serpientes

La mayoría de los estudios en el grupo de las serpientes han tenido un enfoque ecológico (Secor y Nagy, 1994; Maciel *et al.*, 2003). Por consiguiente, se han enfocado en el efecto que producen las condiciones del ambiente externo como el clima (luz, temperatura, humedad, etc.), ubicación geográfica y algunas variables propias del organismo como la edad o condición fisiológica en su actividad y movimiento; clasificando a las serpientes burdamente como diurnas o nocturnas (Shine, 1979; Secor, 1994; Daltry *et al.*, 1998; Whitaker y Shine, 2003; Tozetti *et al.*, 2009).

Por otro lado, las pocas investigaciones que buscan el mecanismo celular (i.e. reloj biológico) que controla los ritmos biológicos en las serpientes, se han enfocado en los efectos de la pinealectomía y en los efectos de la administración exógena de melatonina sobre los ritmos de actividad o sobre los ciclos reproductivos en una sola especie, *Thamnophis sirtalis parietalis* (Crews *et al.*, 1998; Mendonca *et al.*, 1995, 1996a, 1996b). Sin considerar que estos estudios se han realizado sólo en una especie de serpiente, han confirmado que la glándula pineal es un transductor endócrino que detecta cambios lumínicos y térmicos y que es parte de un sistema multioscilador; también mencionan que puede tener una importante implicación en el comportamiento reproductivo. Sin embargo, estos estudios no profundizan en la capacidad de la glándula pineal como marcapasos circadiano y se enfocan en ritmos de mayor duración (e.g. ciclos reproductivos).

Aunque en algunas especies de lagartijas se ha comprobado que el NSQ o la glándula pineal son el marcapasos central para los ritmos de actividad, no se puede asegurar que en las serpientes estas estructuras tengan la misma función. Tosini (1997) ha demostrado que el complejo pineal en

la clase Reptilia presenta una gran variabilidad, tanto a nivel de estructura como neuroendocrino y un claro ejemplo es la carencia de células fotorreceptoras en la pineal de las serpientes (Quay, 1979). De la misma manera, estudios recientes de morfología cerebral en el suborden Serpientes han confirmado una gran variabilidad en diferentes familias, se ha encontrado variación en el desarrollo del techo óptico, en el bulbo olfatorio y en la glándula pituitaria (Allemand *et al.*, 2017) (Figura 3).

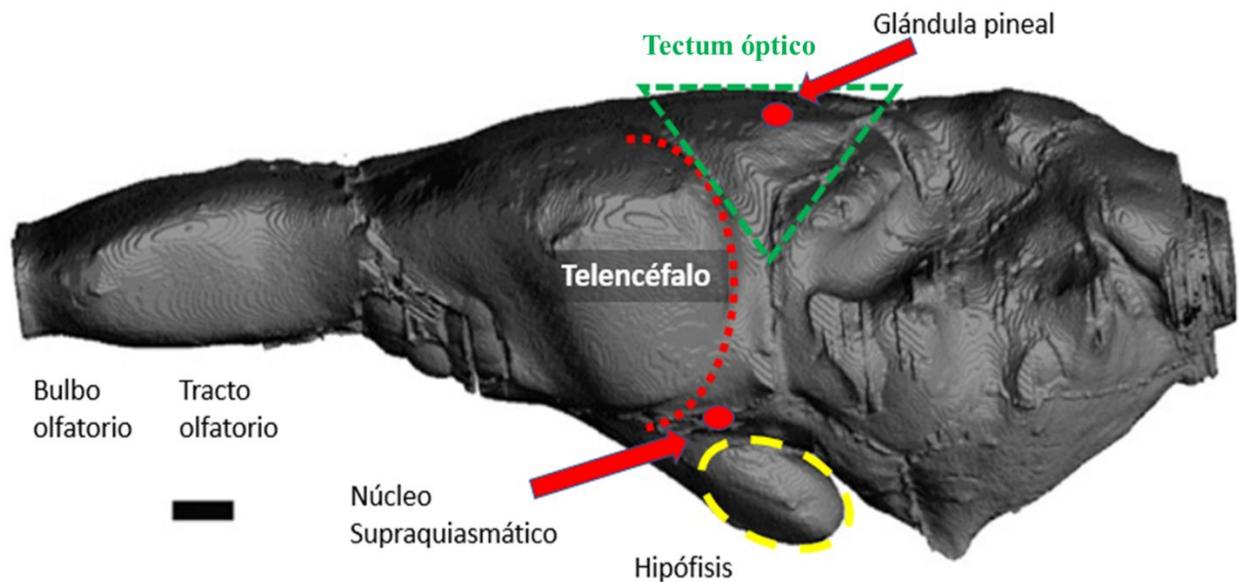


Figura 3. Molde interno de la bóveda craneal de *Crotalus atrox* obtenido mediante tomografía computarizada. Se marcan con círculos rojos las zonas en donde se localizan los posibles marcapasos circadianos, como la glándula pineal y el núcleo supraquiasmático. Escala barra negra: 1 mm (Modificado de Allemand *et al.*, 2017).

Aunado a la variación morfológica, las serpientes de las familias Boidae y Viperidae pueden realizar la mayoría de sus procesos biológicos como reproducción, forrajeo, búsqueda de refugio, interacciones entre predador y presa (Kardong y Mackessy, 1991) o localizando refugio térmico (Krochmal y Bakken, 2003) sin necesidad de los ojos. Esto se debe a que cuentan con otros sistemas sensoriales ya sea quimiorreceptores como el órgano vomeronasal y el pasaje nasal (Graves y Duvall, 1985; Chiszar *et al.*, 1986), mecano-receptores en la piel (Proske, 1969), o los

térmico/visuales, como las fosetas termosensibles (Campbell *et al.*, 2002). Sin embargo, la participación de estos biosensores y estructuras asociadas en el control de los ritmos circadianos se desconoce.

3.2.4 Estudios realizados en serpientes con ciclos de luz y temperatura

Los estudios que abordan la actividad locomotriz de las serpientes enfrentan obstáculos que incluyen la dificultad de observar a los individuos en la naturaleza, la corta duración de muchos estudios y la escasez de información sobre neonatos (Secor, 1994; Whiting *et al.*, 1996). Los pocos datos conocidos se infieren a partir de algunos especímenes observados en el campo (Beck, 1995), por lo que son evidencias circunstanciales y pueden no reflejar la conducta del grupo.

Pocas investigaciones han analizado la influencia de la luz y la temperatura en los ritmos de actividad locomotriz en las serpientes. Griffiths (1984) encontró que, en la boa de arena *Eryx conicus* (Boidae) de actividad nocturna en vida libre, en organismos criados en cautiverio, el ciclo luz/oscuridad es un buen sincronizador de la actividad locomotriz. Este investigador también propuso que los ciclos térmicos no son un buen sincronizador para los ritmos de actividad, aunque estos resultados deben tomarse con cautela, debido a que, para determinar si la temperatura sincroniza el ritmo de actividad, mantuvieron a los organismos en luz constante, lo que ha demostrado, una alteración del ritmo de actividad en varios organismos, como ratas (Wideman y Murphy, 2009; Tapia-Osorio *et al.*, 2013) y serpientes (Pereira da Cruz *et al.*, 2008a). Además, solo una de cinco serpientes mostró indicios de ser sincronizada por temperatura. Las temperaturas utilizadas en los ciclos térmicos de este estudio fueron de 20 ± 3 °C a 26 ± 3 °C. De la misma manera, en las especies de serpiente subterráneas *Typhlops pusilla* y *Typhlops biminiensis* de República Dominicana y Bahamas, se comprobó un ritmo circadiano de actividad sincronizado por luz con preferencias nocturnas (Thomas y Thomas, 1978).

La acción conjunta de ambos sincronizadores influye en la expresión del ritmo de actividad dependiendo de la especie. Por ejemplo, la culebra de agua *Thamnophis radix hayendi* de Cologne, Minnesota (EUA), muestra actividad diurna bajo ciclos de luz y oscuridad a baja temperatura, pero modifica esta actividad a nocturna cuando la temperatura aumenta (Heckrotte, 1975). Debido a esto, el autor concluye que este organismo es una excepción a la regla de Aschoff, y asimismo, confirma la importancia de la temperatura en la actividad locomotriz de estos organismos. En la culebra de agua *Nerodia rhombifera* de Oklahoma (EUA), Tilden y Hutchinson (1993) encontraron que los niveles de melatonina en suero muestran un claro ritmo diario que es afectado por el fotoperiodo y la temperatura en la que la amplitud del ritmo aumenta a mayor temperatura. Respecto a estudios de mayor duración, se demostró que, la serpiente de agua *Thamnophis sirtalis* en Chatfield, Manitoba, Canadá, durante el otoño presenta un ritmo diario de melatonina en plasma, en invierno, bajo condiciones de hibernación (4°C, en oscuridad constante), no se encontró ningún ritmo de melatonina en plasma y que en primavera, los niveles de melatonina se elevaron rápidamente una hora después de salir de la hibernación y el ritmo diario se restableció 24 horas después (Mendonca *et al.*, 1995). Estos resultados indican que la concentración de melatonina en plasma presenta cambios estacionales y que puede servir como sincronizador y modulador de la actividad sexual en esta especie.

Estudios más recientes han evaluado la influencia de fotoperiodos en la actividad locomotriz en vipéridos. A continuación, se presenta un resumen de estas investigaciones. En la víbora *Bothrops jararaca* en el Estado de Santa Catarina, Brasil, se detectó un ritmo de actividad unimodal (una sola fase de actividad en un ciclo de 24 horas) cercano a 24 horas con actividad nocturna y éste muestra un ritmo en oscilación espontánea por lo que se considera circadiano (Pereira da Cruz *et al.*, 2008b). En otra especie similar, *Bothrops jararacussu* en el Estado de Santa Catarina, Brasil, se asume un ritmo endógeno sincronizado por la luz, con actividad preferente al

final del ciclo luminoso y durante la fase oscura. Sin embargo, en condición de oscuridad constante el ritmo al parecer se suprime y en luz constante se fragmenta (Pereira da Cruz, 2006, 2007; Pereira da Cruz *et al.*, 2008a). El no presentar ritmo durante la fase oscura puede ser debido a un enmascaramiento o probablemente ocasionado por una situación ajena al sistema circadiano; por ejemplo, el proceso de muda (el presente estudio). No obstante, no se puede asegurar que el ritmo sea circadiano y se requieren más estudios al respecto. A pesar de esto, los autores concluyen que es un ritmo circadiano y que las alteraciones que presenta en condiciones constantes pueden indicar poca flexibilidad en la organización circadiana en respuesta a condiciones ambientales. Otra investigación, con organismos criados en cautiverio de la víbora *Bothrops moojeni* del Instituto Butantan, Brasil, demuestra que esta especie presenta un ritmo de actividad locomotriz cercano a 24 horas y el nivel de actividad disminuye dependiendo la cantidad de comida ingerida (Stuginski *et al.*, 2012); sin embargo, no se define si el ritmo es circadiano. Finalmente, un estudio con la víbora de cascabel de cola negra *Crotalus molossus* en el Pedregal, Ciudad de México, demostró un ritmo circadiano de actividad locomotriz sincronizado por luz y con actividad nocturna en condiciones de cautiverio (Villarreal-Medina, 2018).

La humedad ambiental es otra variable que puede tener efectos en la actividad de las víboras. En diversos estudios se ha demostrado un mayor avistamiento de víboras con respecto a la humedad y o precipitación. Si se supone que un mayor número de avistamientos se debe a una mayor movilidad, la humedad tendría un efecto positivo en la actividad. Daltry *et al.* (1998) tras seguir la actividad del vipérido tropical *Calloselasma rhodostoma* durante cinco meses en el oeste de Malasia, encontraron más ejemplares con mayor humedad ambiental relativa. De la misma manera, en un estudio de un año con el crotálido *Crotalus durissus* en el sureste de Brasil, Tozetti y Martins (2012) encontraron más víboras mientras más húmedo era el ambiente; sin embargo, no encontraron diferencias significativas en capturas de víboras entre la época húmeda y la seca. Así

mismo, estudios con *Bothrops atrox*, una especie tropical de Brasil, han demostrado una correlación entre la humedad relativa y la precipitación con la cantidad de víboras encontradas (Oliveira y Martins, 2001). En otro estudio con el vipérido *Crotalus catalinensis* de la Isla Catalina, Golfo de California, se registraron más víboras durante la época de lluvias (Arnaud *et al.*, 2018). Finalmente, en un estudio con tres poblaciones de *C. triseriatus* en el eje Neovolcánico Transversal, se registraron un mayor número de capturas durante la época de lluvias (Jaramillo-Alba *et al.*, 2020). Es importante considerar que la humedad relativa es parcialmente dependiente de la temperatura y generalmente se correlacionan. Debido a esto, experimentalmente es difícil evaluar la temperatura y la humedad por separado.

3.3 Biología general de la víbora *Crotalus molossus*

La víbora de cascabel de cola negra (*Crotalus molossus*, Baird y Girard, 1853) pertenece a la familia Viperidae y subfamilia *Crotalinae*. Es una víbora de tamaño grande y cuerpo robusto que llega a medir hasta 1.25 m, tiene cabeza triangular y las escamas aquilladas (figura 4). Una particularidad de esta especie es que la parte posterior de la cola es más oscura que el resto del cuerpo (SEMARNAT, 2018). Es una especie generalista con una fuerte afinidad por el terreno rocoso y con frecuencia se encuentra en o cerca de barrancos, acantilados o taludes. Su distribución es amplia (figura 5) con tres subespecies (Liner y Casas-Andreu, 2008) y se ha registrado desde el nivel del mar hasta los 2,930 m.

Esta especie forma parte de tramas tróficas y puede actuar como control biológico de poblaciones de especies consideradas plaga, como la de algunos roedores (Campbell y Lamar, 2004). Culturalmente mantienen un importante simbolismo en las culturas prehispánicas (Castellón-Huerta, 2001); de la misma forma, es parte de los símbolos patrios.



Figura 4. Ejemplar adulto hembra de *Crotalus molossus nigrescens*.

En México, las víboras de cascabel en general se han utilizado desde tiempos prehispánicos de diversas maneras en las industrias peletera, cosmética, alimenticia y medicinal (Gómez-Álvarez *et al.*, 2007). Esta especie se encuentra en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010 bajo la categoría PR (Sujeta a protección especial), en la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) en el Apéndice III y en la lista roja de la Unión Internacional para la conservación para la naturaleza (UICN) en categoría Preocupación Menor (Least Concern).

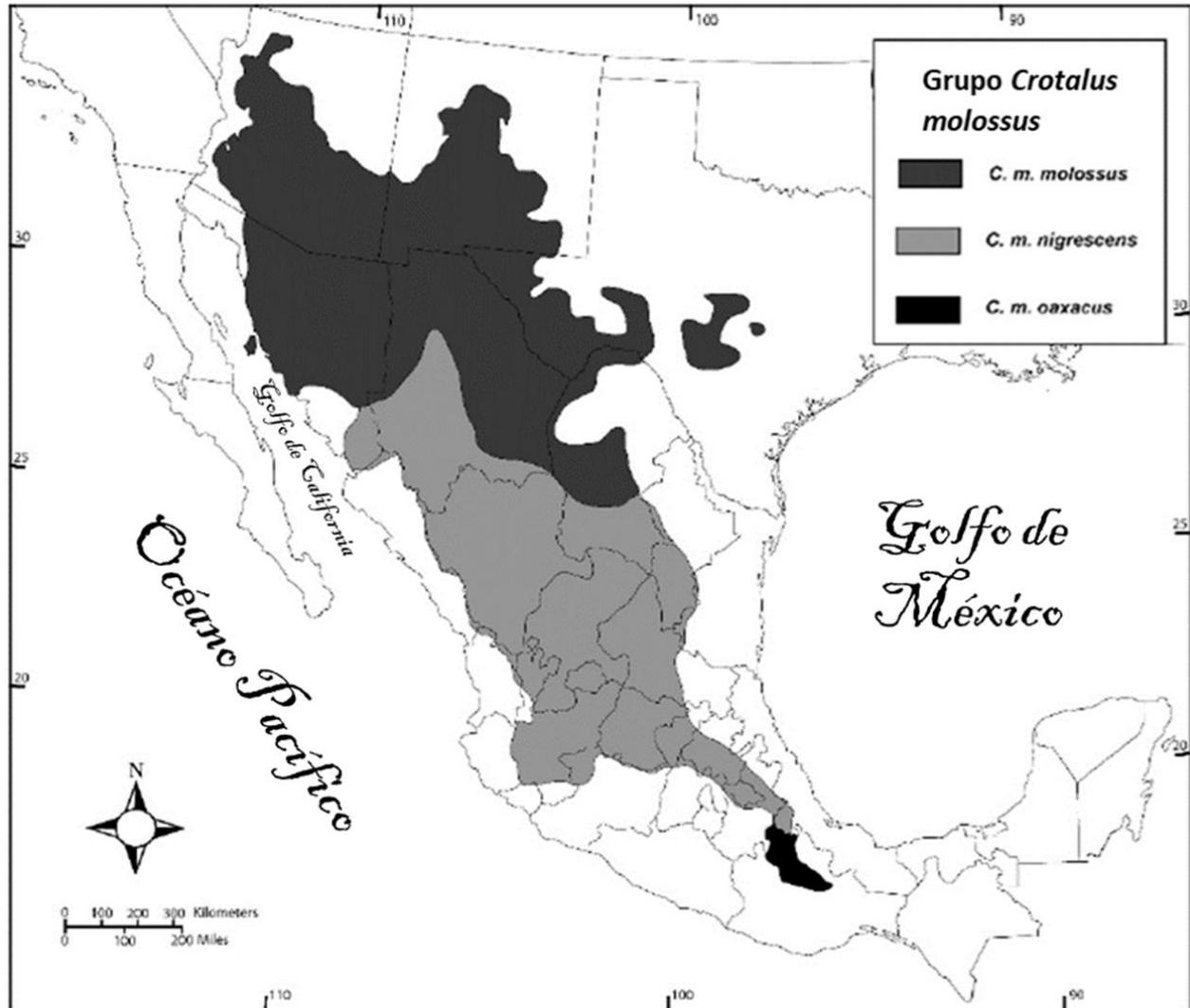


Figura 5. Distribución geográfica del grupo *Crotalus molossus* (Modificado de Anderson y Greenbaum, 2012).

3.3.1 Conducta

La serpiente de cascabel *Crotalus molossus* es un animal rastrero, aunque Campbell y Lamar (2004) han reportado individuos sobre los árboles, y algunos inclusive en las copas. Beck (1995) en Arizona, calculó un rango hogareño promedio de 3.49 hectáreas y un movimiento medio anual de 14.99 km. Así mismo, reportó que la temperatura corporal media de víboras activas fue

de 29.60 °C (Beck, 1995). También se ha registrado que *C. m. nigrescens* puede desplazarse aproximadamente 43 m por día y viajar hasta 15 km en promedio en una sola temporada.

El apareamiento y el nacimiento de las crías es variable debido al alto rango de distribución que poseen. No obstante, tanto Armstrong y Murphy (1979) como Werler y Dixon (2000) reportaron el apareamiento de *C. m. molossus* y *C. m. nigrescens* en la primavera y el nacimiento de las crías entre junio y agosto en el noroeste y centro de México. En Arizona se han reportado apareamientos al inicio de la temporada de lluvias desde finales de julio a principios de septiembre (Greene *et al.*, 2002), en el centro de México, Balderas Valdivia *et al.* (2009) reportaron que, en la Reserva del Pedregal de San Ángel, el inicio de la temporada de reproducción es a principio del verano. Varios estudios indican que *C. molossus* probablemente presente almacenamiento de esperma a largo plazo durante su dormancia en invierno, dándose la ovulación y fertilización a finales de la primavera (Schuett, 1992). Asimismo, se piensa que esta especie presenta un ciclo reproductivo bienal (Goldberg, 1999).

Como la mayoría de los reptiles, esta especie necesita termo-regular, y lo hace por medio de su comportamiento al moverse hacia la temperatura adecuada en el ambiente, desplazándose a la sombra o para asolearse. Se considera un organismo heliotermo; es decir, su termorregulación es conductual y se calientan al asolearse bajo la luz solar (i.e. captación de calor a partir de la radiación solar) y en menor medida tigmotérmico (captación del calor por conducción, poniéndose en contacto con superficies más calientes). *Crotalus molossus* presenta hábitos tanto diurnos como nocturnos, pudiendo modificar su actividad a nocturna debido a altas temperaturas durante el día en un sitio determinado (Armstrong y Murphy, 1979; Hardy y Greene, 1999; Balderas Valdivia *et al.* 2009). Tozetti *et al.* (2009) hipotetizan que la capacidad de cambio de hábito dependiente de la temperatura ambiental refleja un patrón para el género *Crotalus*. Debido a esto, es aún polémico si la actividad de la víbora de cascabel es preferentemente diurna o nocturna.

En el estado de Arizona, EUA, en las montañas Chiricahua, *C. m. molossus*, se ha registrado activa prácticamente durante todo el año, (Armstrong y Murphy, 1979; Tennant, 1984; Beck, 1995). En Nuevo México, Degenhardt *et al.* (1996) colectaron *C. m. molossus* durante todo el año a excepción de los meses de febrero y diciembre. Durante el verano, la mayoría de las víboras fueron crepusculares o nocturnas presentando actividad de 16:00 a 22:00 horas, pero en invierno, primavera y otoño se encuentran a menudo al mediodía, cuando la temperatura es más alta (Greene, 1999; Hardy y Greene, 1999; Green *et al.*, 2002). Estudios en *C. atrox*, en el suroeste de Oklahoma (EUA), respaldan este comportamiento, mostrando que su actividad fluctuó estacionalmente encontrándose a medio día durante el invierno, temprano por las mañanas y en las tardes en primavera y otoño y a media noche en verano (Landreth, 1973).

De la misma manera, más australmente en la Cuenca de México, la subespecie *C. m. nigrescens* es principalmente diurna; sin embargo, se han encontrado ejemplares adultos activos cerca de las 21:00 h (Balderas-Valdivia *et al.*, 2009), aunque también se han señalado periodos de actividad crepusculares (Uribe-Peña *et al.*, 1999). Balderas-Valdivia *et al.* (2009) registraron que el principal periodo de actividad es durante los meses de marzo a noviembre, pero es en la temporada seca, de marzo a mayo, cuando recorren mayores distancias. Se sugiere que la especie no se encuentra activa durante el invierno; sin embargo, se piensa que las víboras salen ocasionalmente de sus refugios en la temporada fría después de varios días soleados. En otras latitudes la actividad es aparentemente diurna, aunque puede ser nocturna en los meses más calientes del verano (Armstrong y Murphy, 1979). En el vipérido *Crotalus triseriatus* en la Sierra del Ajusco, se han calculado temperaturas corporales medias de 20.83°C (García y Güizado, 2008), 21.57°C (Jaramillo-Alba *et al.*, 2020) y 26.24°C (Lemos-Espinal *et al.*, 1997).

Crotalus molossus caza la mayoría de las veces en la noche, al parecer debido a que sus presas más comunes, los roedores, presentan actividad nocturna (Hardy y Greene, 1999; Tozetti y

Martins, 2012). Por revisión de muestras estomacales, se sabe que los roedores constituyen la dieta principal de las víboras adultas, pero incluso se han encontrado restos de murciélagos (Semarnat, 2018). En víboras jóvenes, se han detectado principalmente restos de lagartijas *Sceloporus torquatus* y *S. grammicus*, organismos diurnos (Balderas Valdivia *et al.*, 2009; SEMARNAT, 2018). Estos análisis sugieren que, dentro de una misma población, debido al tipo de alimentación, los organismos juveniles pueden presentar una actividad diurna mientras que los adultos pueden exhibir una actividad nocturna. Las serpientes de cascabel son principalmente depredadores de emboscada y son capaces de esperar a su presa por horas e incluso días (Hardy y Greene, 1999; Greene *et al.*, 2002), lo que dificulta aún más el encontrar un patrón en su conducta. Aunado a esto, se ha especulado que una víbora puede sobrevivir con dos o tres comidas grandes durante un año (Beck, 1995), lo cual podría eliminar la probabilidad de un oscilador sincronizado al alimento, común en mamíferos (Davidson *et al.*, 2003).

Los diferentes patrones de actividad observados indican que, aparentemente, las víboras de cascabel pueden modificar sus hábitos y periodo de actividad debido a diversos factores externos (Uribe-Peña *et al.*, 1999; Campbell y Lamar, 2004; Balderas-Valdivia *et al.*, 2009). Si las condiciones no son propicias para salir de su refugio para termo-regular o buscar alimento, simplemente pueden resguardarse en oquedades, cuevas, o bajo rocas donde la luz es escasa o nula y no estar sujetas a un fotoperiodo regular (Uribe-Peña *et al.*, 1999). Así, pueden encontrar un refugio en el cual mantenerse dentro de un rango térmico adecuado y no tener necesidad de salir por días, incluso semanas dificultando aún más el encontrar un patrón en su actividad (Tozetti y Martins, 2012).

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se ha expuesto, existen múltiples factores que gobiernan la actividad de las serpientes; entre ellos, la luz y la temperatura han sido los más estudiados y aparentemente de mayor influencia en su actividad. Aunque se ha registrado que en algunas serpientes tropicales la humedad o el ciclo lunar pueden ser un factor que influya en su actividad (Clarke *et al.*, 1996; Daltry *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 2008), no se sabe si actúan como zeitgeber y la sincronicen. Para los organismos poiquilotermos, la temperatura puede ser inclusive más importante que la luz como zeitgeber para los ritmos de actividad (Moyer *et al.*, 1997; Maciel *et al.*, 2003; Ellis *et al.*, 2009). Inclusive se ha hipotetizado la capacidad de modificar su actividad dependiendo la temperatura ambiental (Tozetti *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta el momento, no se han realizado estudios con ciclos térmicos y fóticos en la actividad diaria de las serpientes para demostrar qué factor es más importante para sincronizar su actividad.

Debido a que las serpientes son generalmente difíciles de encontrar y monitorear, el enfoque de este estudio será el de observar y describir la actividad diaria mediante el uso de videograbación en el laboratorio (Parpinelli y Marques, 2008; Pereira da Cruz *et al.*, 2008a; Stuginski *et al.*, 2012; Villarreal-Medina, 2018). Esto permitirá analizar la actividad de manera más efectiva, así como reconocer el alcance de esta actividad e identificar picos de actividad, así mismo, se pueden evaluar los diferentes factores que la influyen.

El presente estudio pretende determinar la importancia de ciclos de luz y temperatura como zeitgebers en la sincronización del ritmo circadiano de actividad locomotriz en *C. molossus* y de esta manera establecer una jerarquía entre ambos. Modificando estos factores se planea dilucidar cual es más influyente en sus ritmos de actividad y así poder valorar la importancia de la luz y la temperatura en su comportamiento. Estudios previos han demostrado que esta especie exhibe

ritmos circadianos de actividad locomotriz y que son sincronizados por luz (Villarreal-Medina, 2018). Sin embargo, no se ha comprobado si también son sincronizados por temperatura y de existir esta capacidad, entre que intervalos se encuentra esta sincronización.

Así mismo, se busca conocer el ritmo de actividad en condición de semicautiverio durante el verano y evaluar la influencia que factores como luz, temperatura y humedad tienen sobre estos ritmos y así poder compararlos con los patrones generados en cautiverio. Con esto, se pretende esbozar un patrón de actividad para estos organismos, ya que, a pesar del creciente interés en conocer la actividad de las serpientes, esto sigue siendo una tarea difícil (Marques *et al.*, 2001, 2006; Parpinelli y Marques, 2008).

5 JUSTIFICACIÓN

Los ciclos de temperatura pueden ser un sincronizador de igual o mayor importancia que ciclos de L/O, particularmente para animales que son expuestos a variaciones en su temperatura corporal. Al no conocer cuál es el sincronizador con mayor jerarquía en las serpientes de cascabel, se quiere determinar si la temperatura es dominante sobre el estímulo fótico.

Los estudios de ritmicidad biológica en reptiles se han enfocado principalmente a iguanas, geckos, anolis, lagartijas y tortugas (Foà, 1991; Tosini y Menaker, 1998; Bartell *et al.*, 2004). Como ya se mencionó, los estudios para determinar cuál es el sincronizador de mayor influencia sobre los ritmos, solo se ha examinado en cuatro estudios (Evans, 1966; Lee, 1974; Graham y Hutchison, 1978; Ellis *et al.*, 2009). De estos, ninguno es en serpientes, por lo que los resultados de este estudio arrojarán luz sobre la biología en este grupo, así como en reptiles en general. Debido a esto, este trabajo representa una contribución original respecto al entendimiento de los ritmos circadianos de actividad locomotriz en serpientes y especialmente en *Crotalus molossus*.

Se han realizado estudios de ritmicidad circadiana evaluando ciclos fóticos y su respuesta en la actividad locomotriz en el género *Bothrops* (Pereira da Cruz, 2006, 2007, Pereira da Cruz *et al.*, 2008a, 2008b; Stuginski *et al.*, 2012). Debido a esto, se podrá comparar la biología de especies tropicales en la misma familia para dilucidar similitudes y diferencias en la respuesta a estímulos sincronizadores en el sistema circadiano. Estos hallazgos podrán servir de referencia para estudiar las características conductuales circadianas en víboras de cascabel, así como la fisiología de este grupo.

A pesar del estatus de protección existente para *C. molossus*, la especie se encuentra amenazada. Por lo que es urgente diseñar planes de manejo adecuados para su conservación, para lo cual es necesario investigar a fondo las bases biológicas del comportamiento de la especie.

Debido a varios factores como almacenamiento de grasa, bajo metabolismo, hábitos especie-dependiente, poca información de juveniles, entre otros, el conocer su actividad y tratar de inferir patrones es complicado. Por lo tanto, la comprensión de los efectos de ciclos lumínicos y térmicos sobre la actividad locomotriz contribuirá sustancialmente al conocimiento en su actividad y a la predicción de su gasto energético. Finalmente, debido a su amplia distribución geográfica y variedad de climas en que habita, con condiciones fóticas y térmicas distintas, resulta de interés el conocer las posibles adaptaciones rítmicas a las distintas latitudes en que habita.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Establecer si existe una mayor influencia del termoperiodo sobre el fotoperiodo como sincronizador en el ritmo circadiano de actividad locomotriz de la víbora *Crotalus molossus*.

6.2 Objetivos particulares

1. Determinar las características del ritmo de actividad locomotriz de *C. molossus* en condiciones fóticas y térmicas ambientales naturales y en condición de cautiverio bajo ciclos artificiales impuestos.
2. Evaluar la capacidad de los ciclos térmicos y fóticos para sincronizar la actividad locomotriz de *C. molossus*.
3. Evaluar si existe una influencia diferencial entre los estímulos sincronizadores, luz y temperatura, sobre el ritmo de actividad locomotriz de *C. molossus* en semicautiverio y en condiciones controladas.
4. Comprobar que el ritmo de actividad locomotriz de *C. molossus* es circadiano.
5. Conocer la interacción de los estímulos sincronizadores sobre el ritmo de actividad locomotriz de *C. molossus*.

7 HIPÓTESIS.

Debido a que el ritmo de actividad locomotriz de las víboras es circadiano y se sincroniza a ciclos de luz y oscuridad (Pereira da Cruz *et al.*, 2008a; Villarreal-Medina, 2018), que la actividad en los reptiles se sincronizan a los ciclos de temperatura (Evans, 1966; Griffiths, 1984;) y que las serpientes dependen de la temperatura ambiental para realizar su actividad (Heckrotte, 1975; Tilden y Hutchinson, 1993), se espera que el ritmo de actividad locomotriz de la víbora *Crotalus molossus* sea circadiano y que se sincronizará preferentemente al ciclo térmico antes que al fótico.

7.1 Predicciones

Predicción 1: En condiciones de semicautiverio y de cautiverio, las víboras mostrarán un ritmo asociado a las variables de temperatura y de luz diferencialmente.

Predicción 2: En condición de semicautiverio y en condiciones controladas el ritmo de actividad locomotriz se sincronizará preferentemente al ciclo de temperatura.

Predicción 3: Las víboras expresarán un ritmo de actividad locomotriz endógeno y su periodo será muy cercano a 24 horas.

Predicción 4: Al sincronizarse a un estímulo y presentar otro, en fase o fuera de fase, el periodo del ritmo permanecerá sin cambios, aunque el otro estímulo varíe.

Predicción 5: En presencia de ambos sincronizadores fuera de fase, las víboras se sincronizarán a uno preferentemente.

Predicción 6: En presencia de ambos sincronizadores en fase el uno con el otro, el ritmo se sincronizará de manera más eficaz y presentará mayor amplitud.

8 MATERIALES Y MÉTODO

8.1 Obtención y mantenimiento de los organismos de estudio

Se realizaron muestreos diarios en la Reserva del Pedregal de San Angel en los meses de septiembre, octubre y noviembre de 2018 y de febrero a septiembre de 2019. En total se recolectaron nueve víboras de cascabel de la subespecie *Crotalus molossus nigrescens*, de las cuales ocho se utilizaron en todo el experimento y a la novena, que era un juvenil, sólo se le realizó el experimento de semicautiverio. Las serpientes se numeraron siguiendo el patrón de colecta para identificar el organismo y lugar de colecta. Siete fueron machos y dos hembras. Los animales variaron de 64 a 110.50 cm en longitud total (media= 98.90 cm; D. S= 15.24 cm) y de 259.61 a 894.37 g en peso (media= 654.21g; D. S: 259.61 g). Se organizaron dos grupos, comprendiendo cuatro víboras cada uno y se acomodaron en el orden en que se capturaron (Cuadro 1). Al finalizar la investigación se regresaron los ejemplares al mismo sitio de captura.

Cuadro 1. Víboras capturadas separadas por grupo, estadio y sexo.

Grupo	Víbora	Sexo	Estadio		Grupo	Víbora	Sexo	Estadio
1	1	Macho	Adulto		2	5	Hembra	Adulto
	2	Macho	Adulto			6	Macho	Adulto
	3	Macho	Adulto			7	Macho	Adulto
	4	Macho	Adulto			8	Macho	Adulto

8.2 Protocolo experimental de ritmos biológicos

Para abarcar todas las posibilidades de respuesta y discernir entre efectos, el protocolo experimental consistió de dos fases (Cuadro 2). La fase 1, en condiciones de semicautiverio, evaluó las condiciones naturales de luz, temperatura y humedad; y la fase 2, en condiciones de cautiverio, evaluó los efectos de ciclos fóticos y térmicos en ambientes controlados.

Cuadro 2. Protocolo de registro de actividad por individuo colectado.

Experimento	Condición	Duración (días)	Días totales
	Colecta de ejemplar	1	1
Fase 1: Semicautiverio	Aclimatación al encierro	10	2 – 11
	Luz, temperatura y humedad naturales.	10	12 – 21
Fase 2	Alimentación y aclimatación al encierro L/O 12:12 a 30 °C	10	22 - 31
Etapa 1 Ritmo endógeno y la luz como sincronizador. Temperatura a 30 °C	L/O 18:6	10	32 – 41
	Libre corrimiento O/O	10	42 - 51
	L/O 12:12 (Resincronización)	10	52 – 61
Alimentación y limpieza	L/O 12:12 a 30 °C	10	62 – 71
Etapa 2 La temperatura y la luz como sincronizadores	Condición 1 30 °C/20 °C a 12:12 en O/O	10	72 – 81
	Condición 2 30 °C/20 °C a 18:6 en O/O	10	82 – 91
	Condición 3 30 °C/20 °C a 18:6 y L/O 12:12	10	92 - 101
Alimentación y limpieza	L/O 12:12 a 30 °C	10	102 - 111
	Condición 4 (Conflicto) 30 °C/20 °C 12:12 L/O 12:12	10	112 - 121
Total		121	121

8.2.1 Fase 1. Condición semicautiverio con condiciones naturales de luz, temperatura y humedad.

Para poder medir los ritmos naturales que tenían las serpientes de cascabel antes de la captura, cada serpiente capturada se trasladó al Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, donde permanecieron en encierros de semicautiverio hasta conjuntar las cuatro serpientes del grupo. Los experimentos se realizaron en un espacio asignado dentro del invernadero de cactáceas del mismo Jardín Botánico. Las serpientes se colocaron en encierros individuales de 90 x 90 x 90 cm bajo condiciones naturales de luz, temperatura, humedad y sonido (Figura 6). Los encierros se cubrieron con malla sombra para homogeneizar los niveles de iluminación y prevenir exceso de radiación solar. Los luxes dentro de los encierros oscilaron entre los 20 mil y 25 mil a

medio día. Antes del experimento se alimentaron y se aclimataron a los encierros por 10 días y posteriormente se grabó su actividad por diez días. El primer grupo se colocó en experimentación del 22 de junio de 2019 al 01 de julio de 2019 y el segundo grupo del 12 de julio de 2019 al 21 de julio de 2019. Los grupos experimentales se iniciaron con diez días de diferencia debido a la duración del proceso de aclimatación al encierro que lleva cada grupo.



Figura 6. Encierros de semicautiverio en el Jardín Botánico (UNAM).
Medidas 90 x 90 x 90 cm.

Para los experimentos se videograbaron a los organismos individualmente con cámaras digitales (marca MERIVA) para exterior con visión diurna y nocturna. Los videos se analizaron individualmente para cuantificar el tiempo total de movimiento de las víboras en segundos y posteriormente se agruparon los datos en bloques de 15 minutos en el programa Excel. Se

registraron los parámetros ambientales de temperatura (°C) y humedad (%) en dos encierros usando Data-Loggers (marca HOBO) y por medio de la Red Universitaria de Observatorios Atmosféricos, del Observatorio de Ciudad Universitaria (RUOA, 2020) se obtuvieron datos de irradiancia (Watts/m²) de la zona; esto con el fin de realizar una relación de la actividad locomotriz de las víboras con parámetros ambientales naturales.

8.2.2 Fase 2. Condiciones controladas de luz, temperatura y humedad.

Finalizando la fase 1, los organismos se trasladaron al Bioterio para la Experimentación Zoológica (BEZ) del Instituto de Biología de la UNAM, donde las serpientes se mantuvieron en encierros individuales de 30 x 40 x 20 cm (largo x ancho x alto) con fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (L/O 12:12, 200 lux), con temperatura estable de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $60 \pm 5\%$ hasta su uso en la experimentación. Durante este periodo de espera se alimentaron con ratones vivos cepa CD-1 en función del peso de la serpiente cada 20 días y agua disponible *ad libitum*, suministrada por medio de bebederos que se colocaron al inicio de cada fase y antes de la condición 4.

Durante el experimento, cada serpiente fue colocada en encierros individuales idénticos en proporciones a los encierros de semicautiverio en la fase 1 (Figura 7). Durante el experimento en cautiverio la luz del fotoperiodo fue provista mediante el uso de luz blanca con módulos flexibles de diodos emisores de luz (LED) para iluminación resistentes al agua de tres diodos (marca HanleyLED) que no producen calor, colocadas a una distancia desde los 70 a 90 cm sobre el área de prueba. La periodicidad de la luz fue mantenida mediante el uso de temporizadores digitales y la intensidad de iluminación se mantuvo similar entre los encierros, las medidas del luxómetro variaron entre 252.3 a 256.5 LUX.

La temperatura fue controlada mediante un sistema de temporizadores y un termostato digital que controlaban dos radiadores de aceite (marca Commercial Electric) para aumentar la temperatura. Este mismo sistema también controlaba un aire acondicionado portátil de 12 mil BTU's (marca Frikko) y un extractor para disminuir la temperatura. La humedad se mantuvo mediante el uso de un humidificador y recipientes con agua dentro del cuarto. Todos estos factores se monitorearon con cuatro termohigrómetros, dos se colocaron a distintas alturas dentro del cuarto y otros dos dentro de los encierros. De esta manera se mantuvo la temperatura y humedad igual dentro y fuera de los encierros.

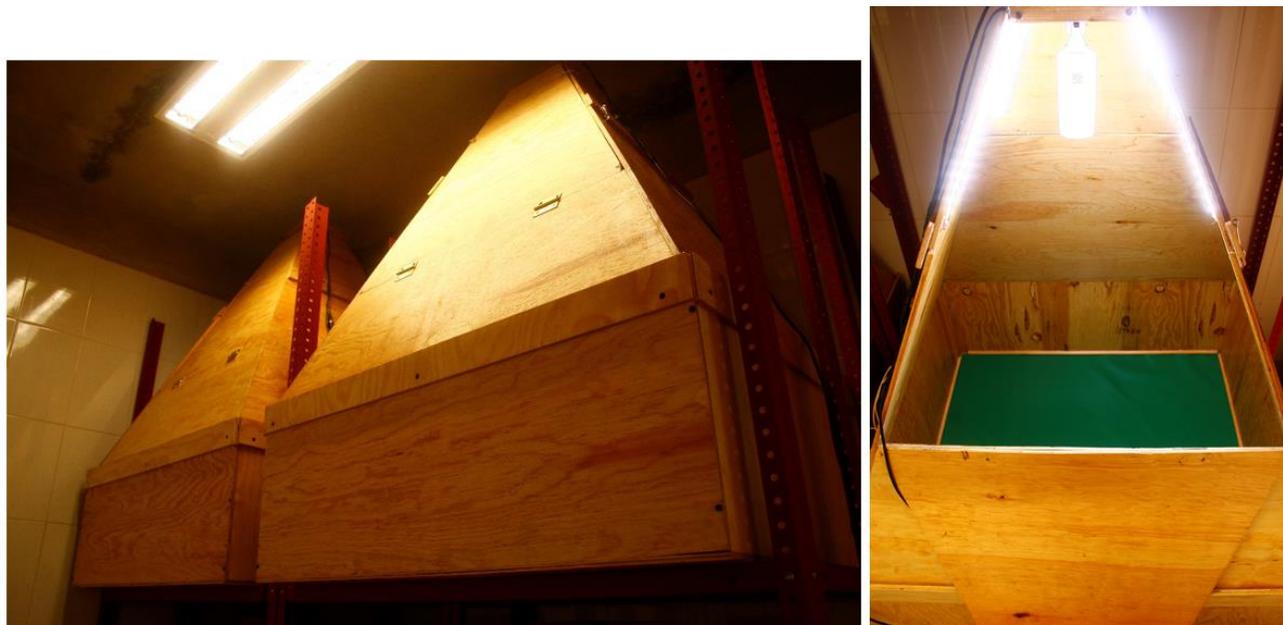


Figura 7. Encierros individuales de cautiverio realizados con madera utilizados para videograbación.

Medidas 90 x 90 x 90 cm.

La fase 2 se inició inmediatamente después de terminada la fase 1. Se trasladaron a los organismos a encierros con condiciones controladas de luz, temperatura ($30 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad ($60 \pm 5\%$) y sonido, donde se aclimataron por 10 días (Firth y Keenaway, 1989; Bartell *et al.*, 2004)

con fotoperiodo L/O 12:12 alimentándolas al tercer día, para que al décimo día iniciaran la experimentación después de la digestión y de haber defecado. La fase 2 constó de dos etapas:

Etapas 1 y 2. La luz y temperatura como sincronizadores.

La etapa 1 tiene tres finalidades, primero, demostrar que el ritmo de actividad es en efecto, circadiano, se espera que al mantener a las víboras en libre curso (oscuridad constante, O/O), presenten un periodo de actividad cercano a 24 horas. Segundo, comprobar la influencia de la luz como sincronizador del ritmo de actividad. Finalmente, observar el efecto que tiene un fotoperiodo de días largos (18 horas luz y 6 oscuridad) sobre el ritmo y el tiempo de actividad (α , α).

En esta etapa, las víboras se expusieron a una sola temperatura de 30 ± 1 °C y los encierros se mantuvieron con una humedad del $60 \pm 5\%$ y lo único que se manipuló fueron los fotoperiodos. Después de los 10 días de aclimatación, las víboras se colocaron en condición L/O 18:6, fotoperiodo 18 horas luz y 6 horas de oscuridad, (fotofase de 01:00 – 19:00h y escotofase de 19:00 - 01:00h, hora estándar del centro, CST) por 10 días, inmediatamente pasaron a condición O/O, libre curso u oscuridad constante durante 10 días, y al finalizar, se pusieron en condición L/O 12:12 (fotofase de 07:00 – 19:00h y escotofase de 19:00 – 07:00, CST) por 10 días (Cuadro 2).

Finalizando la etapa 1 se inició la etapa de alimentación y de limpieza en condiciones de L/O 12:12 (fotofase de 07:00 – 19:00h, CST) y 30 °C durante 10 días. Cada víbora se alimentó con un ratón vivo cepa CD-1 y se esperó a que defecaran (5 días en promedio). Al día siguiente de la excreción, las víboras se retiraron durante 30 minutos para la limpieza de los encierros. Finalmente, se esperó a que concluyeran los 10 días de la etapa de limpieza monitoreando a los individuos y se procedió a la etapa 2.

La etapa 2 constó de cuatro condiciones distintas y tiene tres finalidades. Primero, las condiciones 1 y 2 determinan si el ritmo de actividad se sincroniza a ciclos térmicos y durante qué

parte del ciclo (termofase o criofase) realizan su actividad. Segundo, con la condición 2, observar el efecto que tiene un termoperiodo largo (18 horas a 30 °C y 6 horas a 20 °C) sobre el ritmo y el tiempo de actividad (α). Finalmente, con las condiciones 3 y 4, definir cual zeitgeber, la luz o la temperatura, tiene mayor influencia sobre la actividad y cuál sincroniza más eficientemente el ritmo de actividad. Durante esta etapa se emplearon dos temperaturas, una termofase de 30 °C y una criofase de 20 °C y éstas se manipularon para completar un ciclo de 24 horas. Estas temperaturas se seleccionaron tomando en cuenta experimentos previos realizados en reptiles, en donde una diferencia de 10 °C en el intervalo de temperaturas de 15 a 30 °C produjo resultados significativos (Evans, 1966; Lee, 1974; Graham y Hutchison, 1978; Griffiths, 1984; Ellis *et al.*, 2009). Las primeras dos condiciones se mantuvieron en oscuridad constante y en la tercera y cuarta, se aplicó simultáneamente un fotoperiodo L/O 12:12.

Las primeras dos condiciones de esta etapa se realizaron en oscuridad constante para descartar un potencial enmascaramiento generado por los ciclos L/O sobre el ritmo de actividad locomotriz. Este diseño experimental permitió determinar si el ritmo en libre curso mantenido por las víboras se sincronizaba a los ciclos de temperatura impuestos. Así mismo, dentro del intervalo térmico, definir el momento en que realizan su actividad. La tercera y cuarta condición, a las que se les agregó simultáneamente un fotoperiodo L/O 12:12 permitió determinar si la actividad locomotriz de las víboras era preferentemente sincronizada por ciclos de luz o ciclos de temperatura.

La condición 1 fue en oscuridad constante y, constó de una termofase de 30 °C durante 12 horas y una criofase de 20 °C durante 12 horas, 30 °C/20 °C 12:12 en O/O (termofase de 10:30 – 22:30h y criofase de 22:30 – 10:30h, CST), durante 10 días. Al finalizar, pasaron a la condición 2; manteniéndose en oscuridad constante, se modificó el termoperiodo aumentando la termofase a 18 horas y disminuyendo la criofase a 6 horas, 30 °C/20 °C 18:6 en O/O, durante 10 días (termofase

de 9:00 – 3:00h y criofase de 3:00 – 9:00h, CST). Al concluir esta condición, pasaron a la condición 3; donde se mantuvo el ciclo térmico 30 °C /20 °C 18:6 con los mismos horarios y se agregó un fotoperiodo L/O 12:12 con el encendido de la luz, (fotofase de 3:00 a 15:00h, CST) durante 10 días, 30 °C/20 °C 18:6 y L/O 12:12 (Cuadro 2). Finalizando esta condición se llevó a cabo la alimentación de las víboras y limpieza de los encierros en condición de L/O 12:12 a 30 °C que duró 10 días, de la misma manera que cuando finalizó la etapa 1 (ver arriba). Concluyendo la etapa de limpieza, se procedió a la condición 4, en donde los ciclos fóticos y térmicos se encontraron fuera de fase. Esta condición tiene el fin de resolver cuál de los dos zeitgeber tiene mayor influencia sobre la actividad de las víboras y con cuál se sincronizan. Esta condición tuvo una duración de 10 días y un fotoperiodo L/O 12:12 y un ciclo térmico 30 °C/20 °C 12:12 con las siguientes características: El ciclo fótico se inició a la mitad del ciclo térmico, a las seis horas de iniciada la termofase. La termofase (30 °C) fue de 11:00 a 23:00h CST y la criofase (20 °C) de 23:00 a 11:00h, CST y la fotofase de 17:00 a 5:00h, CST y la escotofase de 5:00 a 17:00h, CST. Para el análisis se consideraron dos ZT0, el inicio de la fotofase (17:00h) y el inicio de la termofase (11:00h).

8.3 Análisis de datos y estadístico

8.3.1 Obtención de datos

La actividad locomotriz de *C. molossus* en todas las condiciones se observó en las grabaciones de video y se transcribieron a mano todos los movimientos realizados en segundos, registrados como segundos de actividad cada 15 minutos. En semicautiverio, los datos de temperatura, humedad e irradiancia se obtuvieron mediante el promedio de dos data-loggers colocados en dos encierros diferentes en intervalos de 15 minutos. En condiciones controladas, los datos de temperatura y humedad se obtuvieron mediante el promedio de dos data-loggers, colocados igualmente en dos encierros distintos, cada 15 minutos.

8.3.2 Análisis estadístico

El tiempo de actividad se agrupó en periodos de 15 minutos y se analizaron con el programa Excel y posteriormente con los programas CronosFit, ActiView y Graph PAD 8. Los actogramas se obtuvieron con los programas CronosFit y ActiView; se compararon en todas las condiciones y en el presente trabajo se utilizaron los de ActiView al ser los más visualmente atractivos. Asimismo, los periodos de los ritmos de actividad se calcularon por medio de un periodograma de Lomb-Scargle (Lomb, 1976) obtenidos con el programa CronosFit y se compararon con los periodogramas de χ^2 (Sokolove y Bushell, 1978) obtenidos con el programa ActiView. En este trabajo se utilizaron los periodogramas de Lomb-Scargle, ya que se ha comprobado que son más precisos para calcular los periodos de análisis de tiempo de corta duración (Tackenberg y Hughey, 2020).

El tiempo total de actividad (α) medido en horas se obtuvo con el programa Excel, se calculó el promedio y se presenta como el promedio de α . Así mismo, las acrofases se obtuvieron por medio del programa Cronosfit. El momento de inicio de la actividad (A_i) y el momento del fin de la actividad (A_f) se calcularon utilizando el método descrito por Pittendrigh y Daan (1976). A_i y A_f se utilizaron como marcadores de fase como el inicio y el término de la actividad locomotriz, respectivamente.

La relación de fase entre el apagado de la luz y A_i ($A_i - \text{LOFF}$) y entre A_f ($A_f - \text{LOFF}$), así como el inicio del termoperiodo entre A_i ($A_i - \text{TON}$) y entre A_f ($A_f - \text{TON}$) se calculó para cada víbora en cada día de grabación en las condiciones que presentan fotoperiodo y termoperiodo. De igual manera, en semicautiverio, la puesta del sol a las 20 h se consideró como el apagado de la luz y se consideraron las 11 h como el inicio del termoperiodo, cuando se rebasaron los 20 °C. Las fases de inicio de actividad (A_i) y de fin de actividad (A_f) se reportan en hora estándar del centro (CST) para la ciudad de México.

Finalmente, con el programa Graph PAD8, se realizaron las gráficas de relación de fase y las pruebas de máxima verosimilitud y de ANOVA de medidas repetidas para examinar si existieron cambios en la duración promedio de los periodos y en el promedio de α respectivamente. Además, se aplicaron las pruebas de Wilcoxon, de Kruskal-Wallis y de Friedman, dependiendo del comportamiento de los datos, para determinar si existieron diferencias significativas en los siguientes parámetros:

- Promedio del periodo del ritmo;
- Tiempo promedio de inicio de la actividad (A_i);
- Tiempo promedio de término de la actividad (A_f);
- Relación de fase entre A_i y el apagado de la luz ($R_f A_i - LOFF$);
- Relación de fase entre A_f y el apagado de la luz ($R_f A_f - LOFF$);
- Relación de fase entre A_i y el inicio del termoperiodo ($R_f A_i - TON$);
- Relación de fase entre A_f y el inicio del termoperiodo ($R_f A_f - TON$).

La etapa 1 se realizó a temperatura constante, debido a esto, las comparaciones que utilizan ciclos de temperatura no son aplicables por lo que no se realizaron. De la misma manera, las condiciones 1 y 2 de la etapa 2, se llevaron a cabo en oscuridad constante, por lo que las comparaciones que implican ciclos de L/O no se realizaron.

8.4 Declaración de ética

Este proyecto se realizó bajo los requerimientos legales del país en el que se llevó a cabo la experimentación y siguió todas las reglas institucionales. Este estudio procedió bajo el permiso especial otorgado por SEMARNAT (SGPA/DGVS/013219//18) y por la Reserva Ecológica del

Pedregal de San Angel (REPSA, Proyecto 465) al Dr. Víctor Hugo Reynoso. Los permisos evaluaron y aceptaron todos los procesos de colecta, manutención y experimentación de los animales. *Crotalus molossus* se encuentra en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010 bajo la categoría PR (Sujeta a protección especial), en categoría Least Concern de la lista roja de la Unión Internacional para la conservación para la naturaleza (UICN) y en el Apéndice III de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). El área en donde se realizó el trabajo de campo forma parte de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Angel y el Jardín Botánico y el Bioterio para la Experimentación Zoológica son parte de la infraestructura del Instituto de Biología de la UNAM.

9 RESULTADOS

9.1 Fase 1: Condición semicautiverio

9.1.1 Comportamiento de las variables ambientales durante el experimento.

El primer día de experimentación, la salida del sol en el grupo 1 fue a las 07:06 y la puesta a las 20:19 y el último día de experimentación, la salida del sol fue a las 07:09 y la puesta a las 20:18 horas, el promedio diario de horas de luz fue de 13 h y 8 min. De la misma manera, en el grupo 2, el primer día de experimentación, la salida del sol fue a las 07:00 y la puesta a las 20:18 y el último día de experimentación, la salida del sol fue a las 07:02 y la puesta a las 20:20 horas, el promedio diario de horas de luz fue de 13 h y 17 min.

La temperatura ambiental ($^{\circ}\text{C}$) dentro de los encierros se mantuvo por debajo de los 17°C desde las 0 hasta las 9 h, presentando valores mínimos de $\sim 8^{\circ}\text{C}$ desde las 6 hasta las 8 h. Desde las 9 h la temperatura comenzó a elevarse a razón de 2.5°C/h hasta las 13 h en los cuales algunos días alcanzaron su máximo, registrando hasta 28.81°C y se mantuvo estable hasta las 16:30 horas, tiempo en el cual otros días mostraron su máximo. Desde las 16 horas aproximadamente, la temperatura comenzó a disminuir a razón de 3°C/h hasta las 22 h cuando se estabilizó alrededor de los 14°C . Desde las 22 hasta las 4 h se mantuvo entre los 12 y 14°C y desde las 4 h disminuyó hasta mostrar sus mínimos (Figura 8). La temperatura ambiental a la que estuvieron expuestos los dos grupos no presentó diferencias significativas ($t_{190} = 1.158$, $p = 0.24$).

La humedad relativa (%) en los encierros se mantuvo por encima del 90% desde las 0 horas hasta su máximo de $\sim 98\%$, que fue registrado entre las 7:45 y 9:30 h. Desde las 9:30 hasta las 14h disminuyó a razón de $7\%/h$ hasta alcanzar los valores mínimos de $\sim 50\%$ en promedio, registrados entre las 13:30 y 16:00. Desde las 16 hasta las 21 h aumentó un 8% de humedad por hora hasta alcanzar 90% y se mantiene por encima de este valor hasta el día siguiente (Figura 8). Si se

encontraron diferencias significativas en la humedad ambiental a la que los dos grupos estuvieron expuestas ($t_{190} = 2.738$, $p = 0.006$).

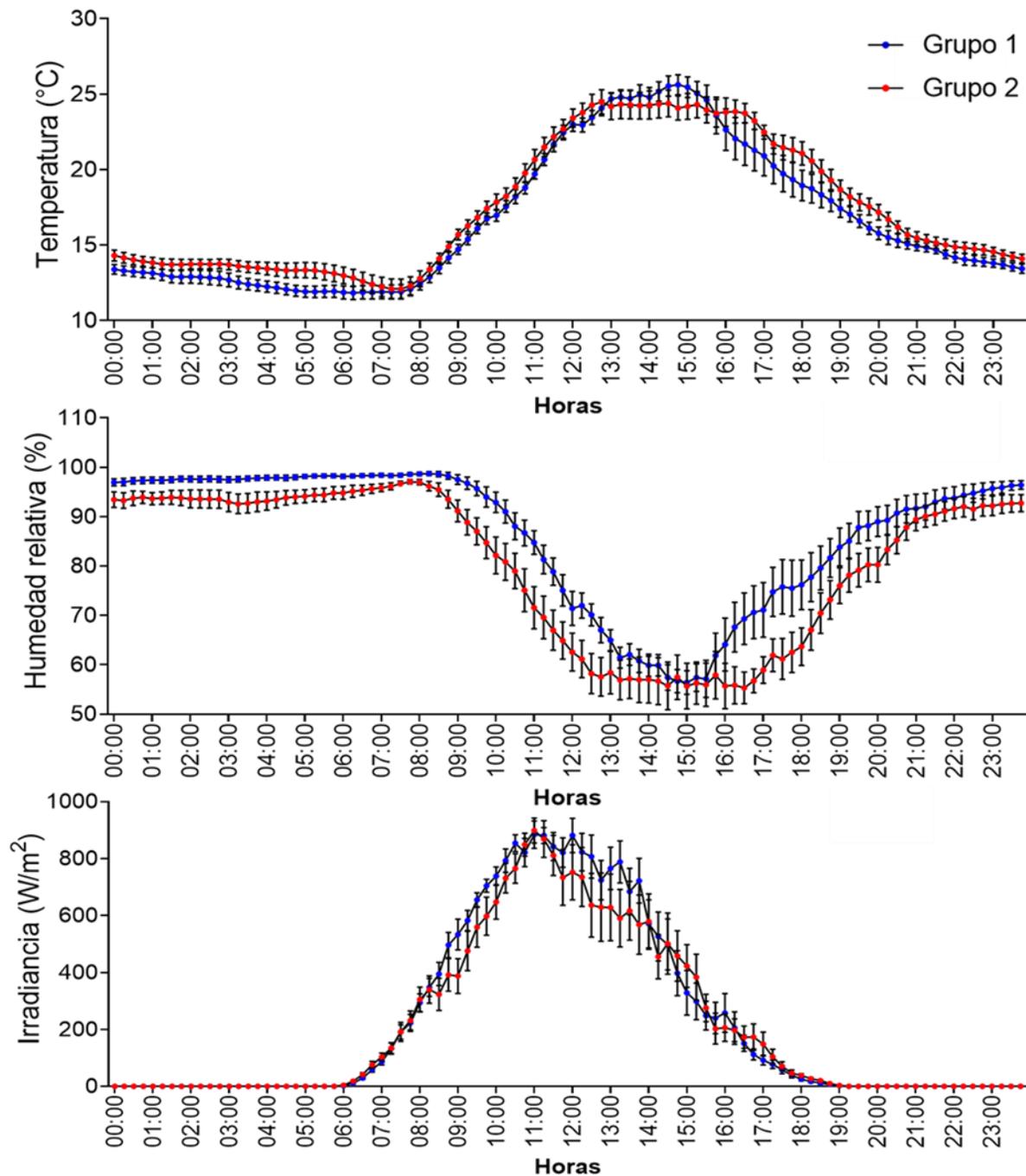


Figura 8. Temperatura, humedad e irradiancia promedio diarias que se presentaron durante la experimentación en los encierros de semicautiverio en los dos grupos experimentales de víboras. Grupo 1. Víboras 1 a 4. Grupo 2. Víboras 5 – 8. Las barras muestran medias +/- SEM.

La irradiancia (Watts/m^2) se mantuvo por debajo de cero, desde las 24 hasta las 6 h, ésta fue incrementándose lentamente desde las 6 hasta las 8 h hasta alcanzar un valor de 100, desde ese momento se elevó abruptamente hasta un valor aproximado de 500 a las 9 h, y continuó elevándose a razón de 100 unidades cada media hora hasta alcanzar su máximo registrado de 1200 Watt/m^2 aproximadamente alrededor de las 11 h y manteniéndose hasta las 12 h. A partir de esta hora, la irradiancia comenzó a disminuir aproximadamente 100 unidades por hora hasta alcanzar cero a las 19 h y se mantuvo por debajo de cero hasta las 6 h del día siguiente (Figura 8). No se encontraron diferencias significativas en la irradiancia a la que los dos grupos estuvieron expuestos ($t_{187.87} = 0.38949$, $p = 0.6974$).

En general, los días fueron soleados hasta las 17 h aproximadamente, cuando se registraron lluvias ligeras (máximo = 29.4 mm de agua para el grupo 1 y 10.7 mm de agua para el grupo 2). Durante el experimento con el grupo 1, no llovió el segundo y el último día, asimismo, no llovió el tercero, séptimo y noveno días mientras el grupo 2 se encontraba en experimentación. Así mismo, se determinó una relación inversamente proporcional entre la temperatura y la humedad, con un coeficiente de correlación negativo para el grupo 1 ($R = -0.97$, $p < 0.0001$) y para el grupo 2 ($R = -0.99$, $p < 0.0001$) (Figura 9), lo que significa que, a mayor temperatura, menor humedad.

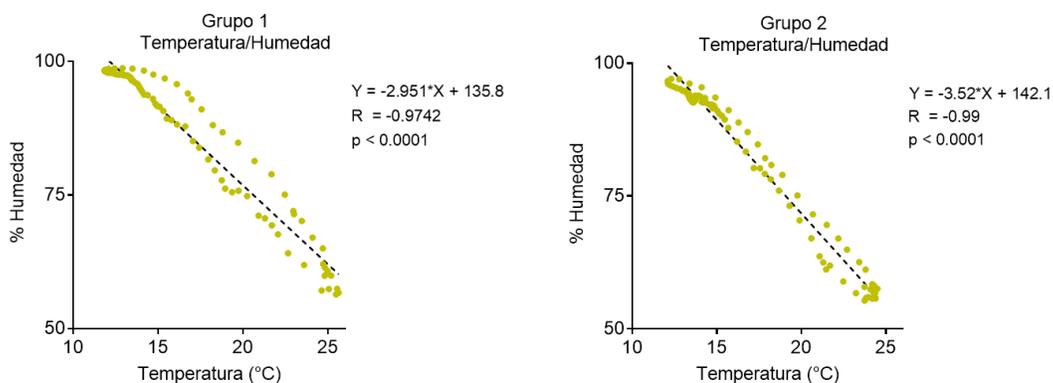


Figura 9. Regresión lineal entre temperatura y humedad registradas en los encierros de semicautiverio en los dos grupos experimentales. Grupo 1. Víboras 1 – 4. Grupo 2. Víboras 5 – 8.

9.1.2 Actividad de las víboras

Las víboras presentaron actividad unimodal, sin embargo, en la curva promedio de actividad se pueden observar dos instantes con movimiento: un pequeño pico alrededor de las 9:45 h debido a que las víboras se desplazaban hacia la luz del sol para termo-regular, y otro pico, a partir de las 13 h, que se consideró como el inicio de actividad (Ai) (Figura 10).

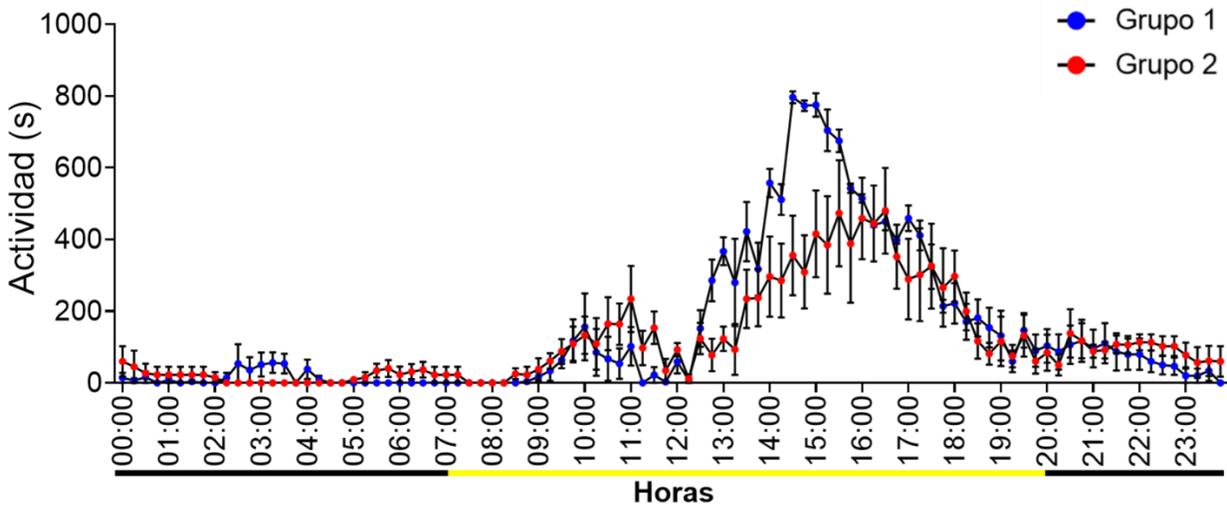


Figura 10. Curva promedio de actividad en semicautiverio de los dos grupos de víboras en segundos de movimiento. Se presenta el promedio de actividad de los 10 días de experimentación de ambos grupos. Grupo 1. Víboras 2 – 4 (n = 3). Grupo 2. Víboras 5 – 8 (n = 4). El individuo uno se excluyó, debido a que presentó actividad nocturna. La barra amarilla representa las horas de luz y las barras negras las horas de oscuridad. Las barras de error muestran medias +/- SEM.

Las nueve víboras presentaron un ritmo circadiano en su actividad locomotriz, con periodos de actividad entre las 23.10 y 24.27 horas (Figura 11 A, Anexo 1). El promedio total de actividad diaria (α) que presentaron las víboras fue desde 3.1 hasta 4.72 horas y no se encontraron diferencias significativas en esta actividad entre ambos grupos experimentales ($t_{190}=1.035$, $p=0.30$) (Figura 11, B).

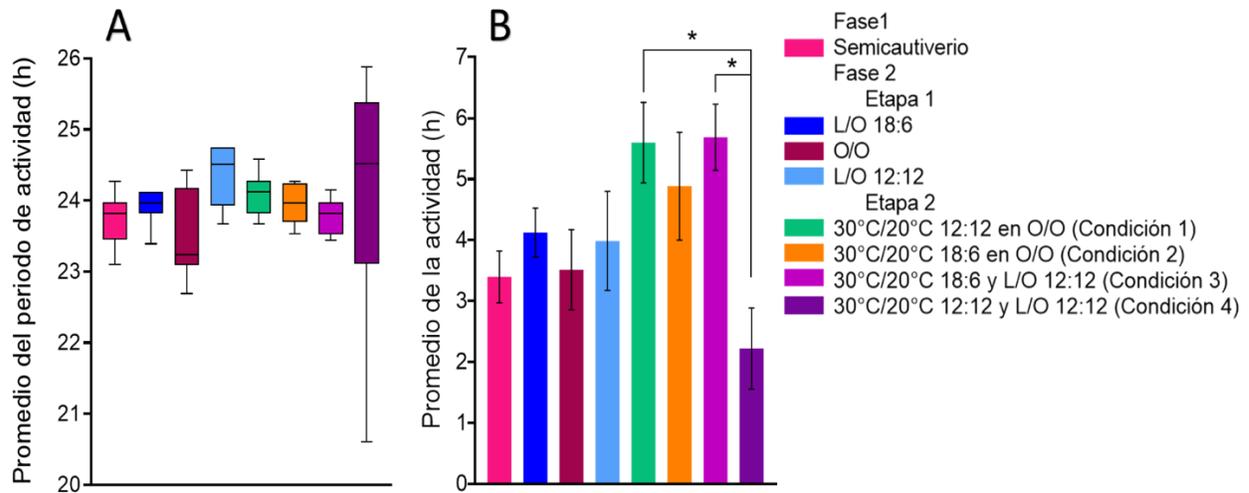


Figura 11. Periodos del ritmo y actividad promedio de las víboras en todo el experimento.
A. Duración promedio de los periodos (en horas) del ritmo de actividad locomotriz de las víboras en todo el experimento (n = 8). **B. Actividad diaria promedio, α (en horas) de las víboras en todo el experimento (n = 8).** Las barras de error muestran medias \pm SEM.
 * = $p < 0.05$, post-hoc Prueba HSD Tukey.

En los actogramas se observa que, de los nueve organismos estudiados, ocho presentaron actividad diurna durante la fotofase, restringida a la termofase, entre las 13 y las 18 horas y una nocturna, entre las 19 y las 24 horas (Figura 12). La víbora 1 fue la única que presentó actividad crepuscular/nocturna y la 9, que era un juvenil continuó su actividad hasta después del ocaso (Figura 12).

No se encontró correlación entre la irradiancia y el movimiento de las víboras en el grupo 1 ($R = 0.222$, $p = 0.03$) ni en el grupo 2 ($R = 0.266$, $p = 0.008$) (Anexo 2). Por el contrario, se observa una fuerte correlación positiva entre la temperatura y el movimiento para el grupo 1 ($R = 0.8112$, $p < 0.0001$) y para el grupo 2 ($R = 0.7882$, $p < 0.0001$) (Figura 13). Así mismo, se registró una fuerte correlación negativa entre la humedad y el movimiento en el grupo 1 ($R = -0.8829$, $p < 0.0001$) y en el grupo 2 ($R = -0.8199$, $p < 0.0001$) (Figura 13).

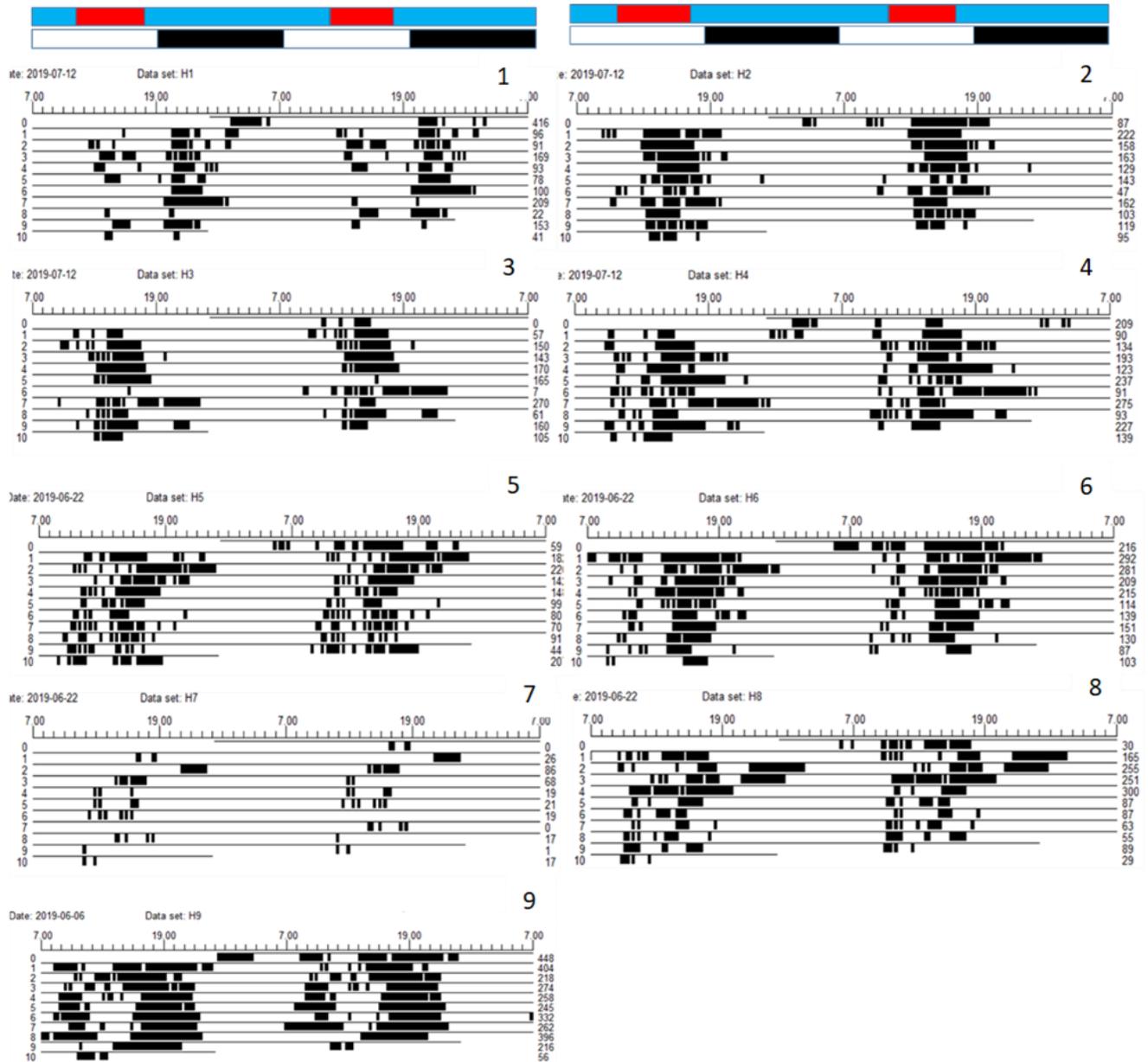


Figura 12. Actogramas de las nueve víboras en condición de semicautiverio. Se observa una sincronización al fotoperiodo con actividad diurna y restringida a la termofase, con excepción del individuo 1 que muestra actividad nocturna y el 9 (juvenil) que extendió en promedio su actividad 2 horas después de LOFF. Barras blancas indican la fotofase y barras negras la escotofase. Barras rojas indican la termofase y barras azules la criofase. Número de víbora indicado en la esquina superior derecha de cada actograma.

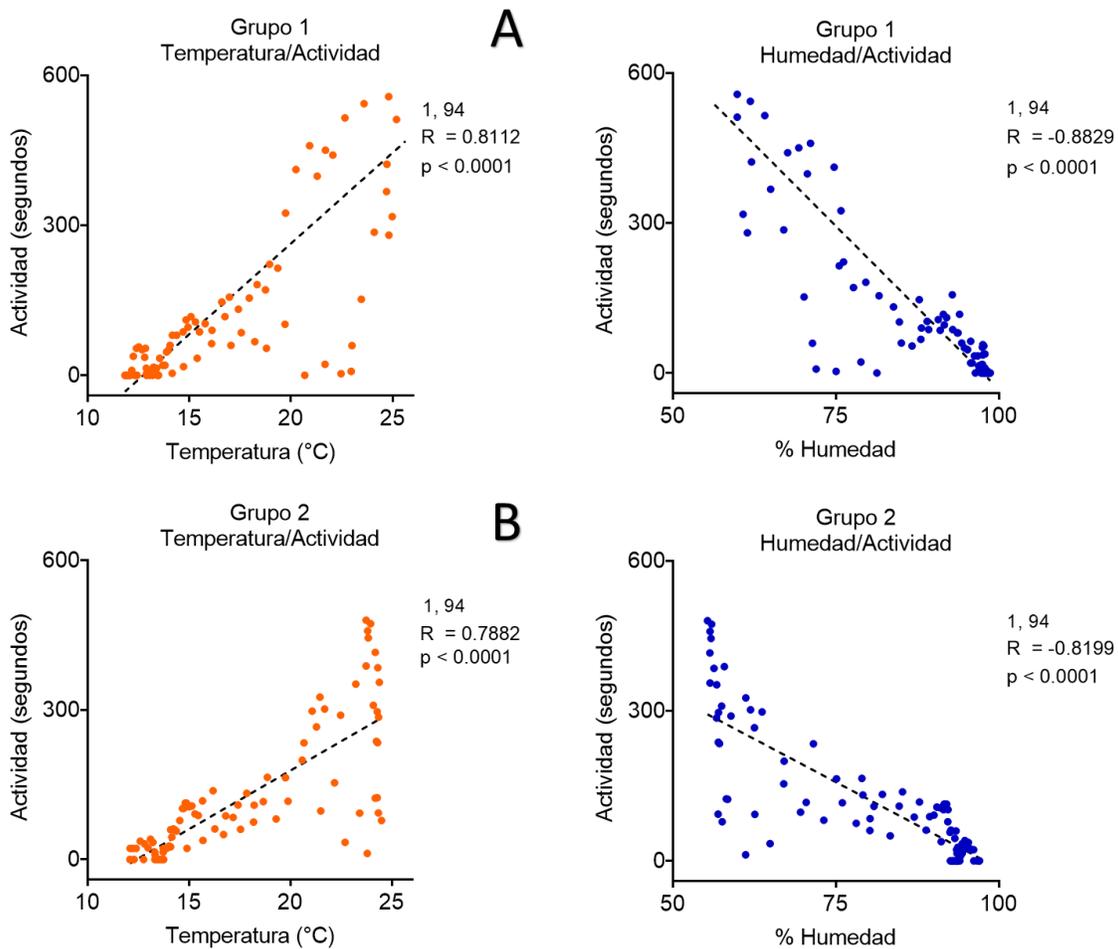


Figura 13. Regresión lineal entre temperatura, humedad y la actividad de las víboras en semicautiverio. A. Regresión lineal del grupo 1 entre la actividad registrada de las víboras y temperatura (izquierda) y humedad (derecha) en condición semicautiverio. B. Regresión lineal del grupo 2 entre la actividad registrada de las víboras y temperatura (izquierda) y humedad (derecha) en condición semicautiverio.

El A_i se encontró más cercano al inicio de la termofase (TON), que al inicio de la fotofase (LON), lo que indica una mayor sincronía con el ciclo térmico y una preferencia por realizar su actividad durante las horas cálidas del día. De igual manera, el fin de la actividad (A_f) se encontró muy cercano tanto al fin de la fotofase (LOFF) como al fin de la termofase (TOFF) (Figura 14). Se realizó una prueba de comparación múltiple de Dunn, y no se encontraron diferencias significativas

entre estos dos momentos ($p > 0.999$). En pocas palabras, las víboras terminan su actividad antes de que baje la temperatura, lo que indica una gran afinidad entre la actividad y la temperatura.

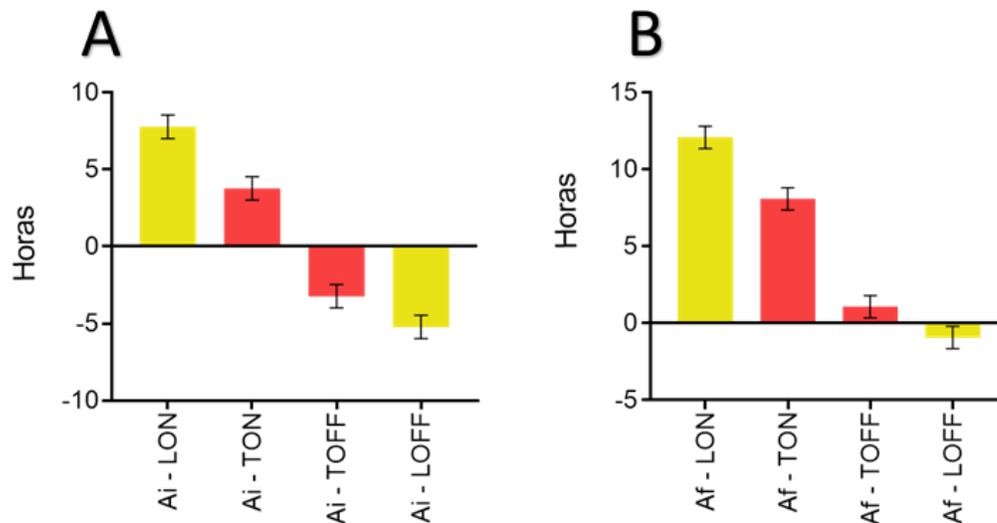


Figura 14. Relación de fase de inicio y fin de actividad en semicautiverio. A. Relación de fase promedio de Ai en semicautiverio contra luz y temperatura. B. Relación de fase promedio de Af en semicautiverio contra luz y temperatura. LON = inicio del fotoperiodo, TON = inicio del termoperiodo, LOFF = fin del fotoperiodo, TOFF = fin del termoperiodo. Las barras muestran la media +/- SEM.

9.2 Fase 2, etapa 1: Ritmo endógeno y la luz como sincronizador: L/O 18:6, O/O, L/O 12:12.

En las tres condiciones de esta etapa, todas las víboras presentaron ritmos circadianos significativos ($p < 0.05$) en su actividad locomotriz. Con excepción de la víbora 4 en O/O, la cual no muestra ningún periodo y casi no presenta movimiento. Sus periodos de actividad se encontraron desde 22.69 a 25.21 horas, siendo O/O la condición con mayor variación (Figura 11 A). Las víboras presentaron un α promedio diario desde 0.12 a 7.85 horas; y muestran diferencias significativas ($F_{7,14} = 3.04$, $p = 0.03$) (Figura 11 B).

En L/O 18:6 el Ai se presentó en promedio 2.96 horas antes del apagado de la luz (LOFF), y en L/O 12:12, 1.18 horas antes. Del mismo modo, en L/O 18:6, el Af se presentó en promedio

0.83 horas antes de LON, y en L/O 12:12, 2.68 horas antes (Figura 15 A). Esto demuestra una sincronización al ciclo L/O con anticipación a la escotofase para el inicio de actividad y una anticipación al encendido de la luz para finalizar la actividad. La sincronización al ciclo L/O se confirma ya que no se encontraron diferencias significativas en la relación de fase entre Ai y LOFF en esta etapa ($F_{3,8} = 4.75$, $p = 0.11$).

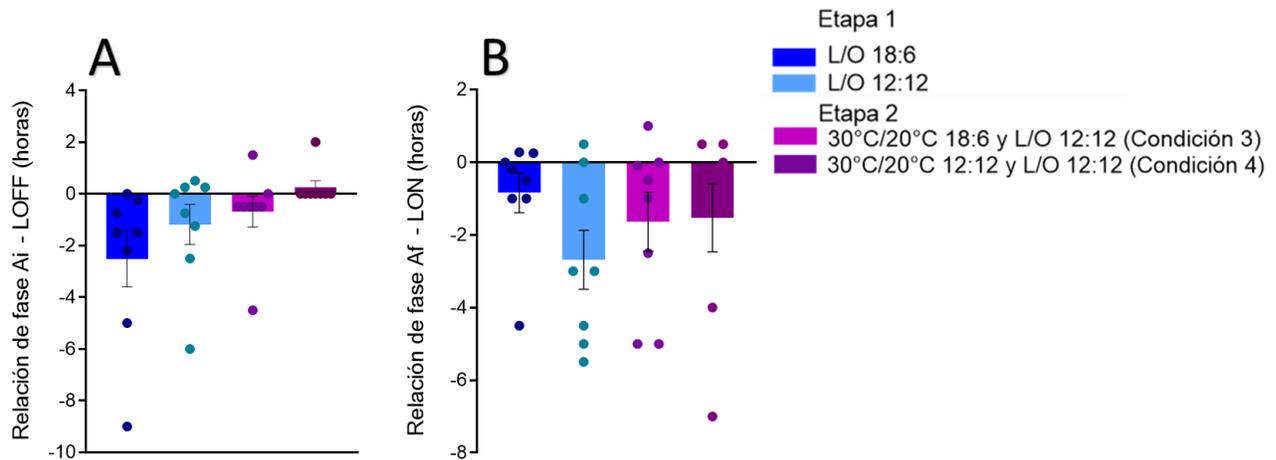


Figura 15. Relación de fase entre Ai – LOFF y Af - LON durante la Fase 2. A. Relación de fase promedio de Ai de la fase 2, etapa 1 y 2, con el apagado de la luz (LOFF). B. Relación de fase promedio de Af de la fase 2, etapa 1 y 2, con el encendido de la luz (LON). Las barras muestran medias +/- SEM.

En la condición L/O 18:6, siete de ocho víboras mostraron una sincronización al ciclo L/O. Cinco víboras mostraron movimiento durante la escotofase, las víboras 2 y 6 presentaron actividad durante la fotofase (Figura 16). La víbora 5 es la única sin un horario definido ya que se encontró activa durante la fotofase y escotofase, esto probablemente se deba a la modificación de la actividad producida por el proceso de muda. En la condición O/O, en el ritmo en libre curso se presentó un adelanto de fase en las víboras 1, 2, 3, 7 y 8, y un atraso de fase en las víboras 5 y 6 (Figura 16). En condición L/O 12:12 todas las víboras mostraron una resincronización al ciclo L/O tardando en promedio de dos a tres días en que la actividad se encontrara en fase con este ciclo. Siete de ocho

víboras mostraron actividad en la escotofase, solo la víbora 2 presentó actividad en la fotofase, de la misma manera que lo había hecho en L/O 18:6 (Figura 16).

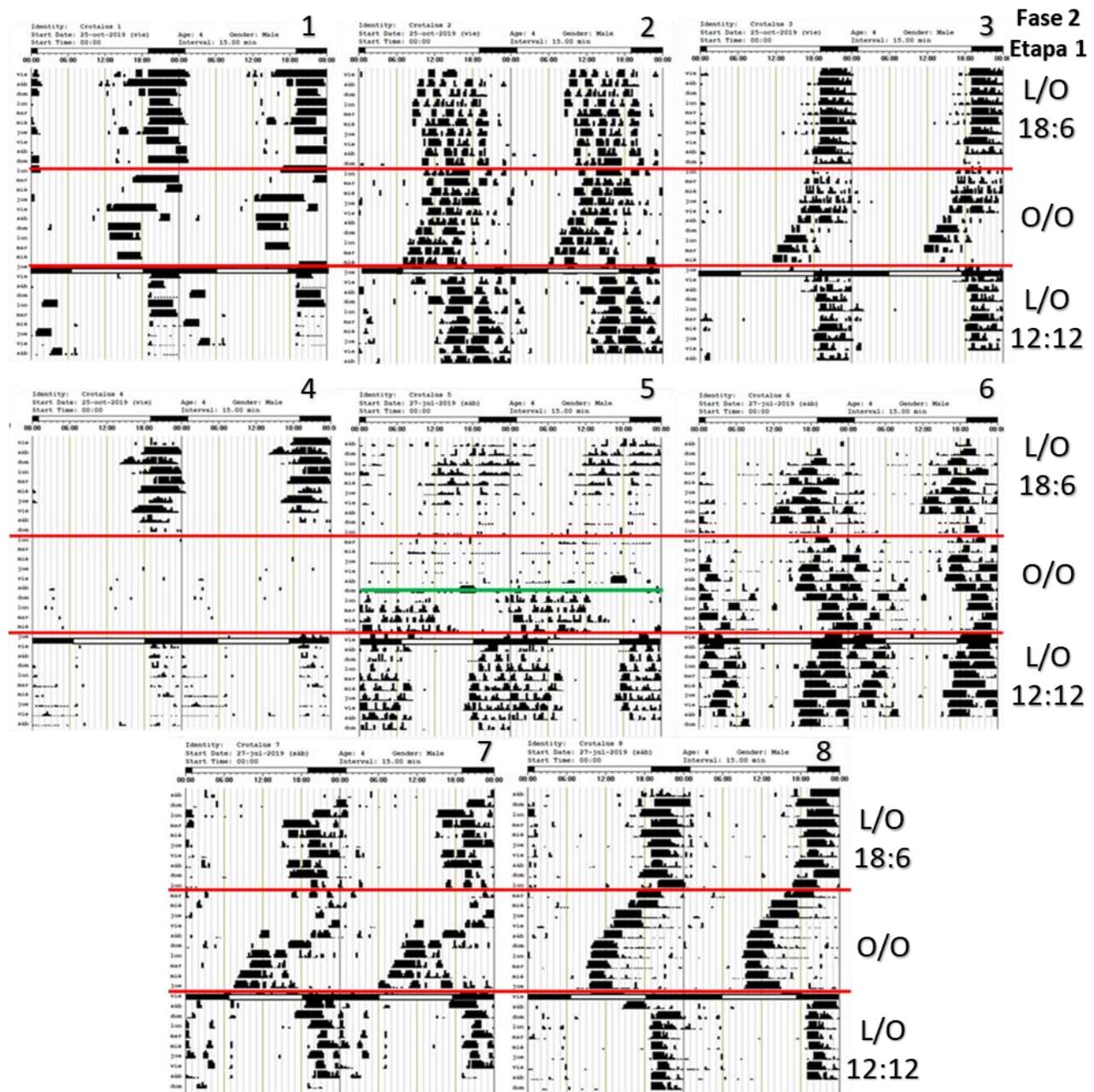


Figura 16. Actogramas en doble gráfica de las ocho víboras en la fase 2, etapa 1. Se muestra la transición de L/O 18:6 a O/O y a L/O 12:12. Se observa una sincronización al ciclo L/O, con actividad durante la escotofase, ritmo en libre curso y una resincronización. Las barras negras arriba de cada actograma representan la escotofase y las barras blancas la fotofase. Las líneas rojas muestran el cambio de condición. La línea verde en la víbora 5 indica el día en que se produce la ecdisis. Número de víbora indicado en la esquina superior derecha de cada actograma.

9.3 Fase 2, etapa 2: La temperatura y la luz como sincronizadores.

En las cuatro condiciones de la etapa 2, todas las víboras presentaron ritmos circadianos significativos ($p < 0.05$) en su actividad locomotriz. Los periodos de las víboras se encontraron desde 20.61 hasta 25.88 horas y la condición 4 fue la que presentó mayor variación (Figura 11). En las condiciones 1, 2 y 3, las víboras mostraron un α promedio diario desde 2.36 hasta 7.78 horas (Figura 11); sin embargo, no presentaron diferencias significativas ($F_{7, 14} = 1.03$, $p = 0.45$).

9.3.1 Sincronización a la termofase

En las condiciones 1 y 2 se observa una sincronización al ciclo térmico, las víboras realizaron su actividad durante la termofase y parte de la criofase. En la condición 1 muestran un A_i promedio de 6.5 horas después del inicio de la termofase (TON) y un A_f promedio de 3.39 horas después de TOFF. En la condición 2, las víboras muestran un A_i promedio de 11.25 horas después de TON y un A_f promedio de 2.35 horas después de TOFF (Figura 17 A, C). Esto indica que, aunque inician su actividad durante la termofase, la continúan durante la criofase. De igual manera, al modificar el termoperiodo a 18 horas, se observa que la actividad sigue al crioperiodo; es decir, se recorre hacia el final de la termofase y se confirma debido a que la relación de fase entre $A_i - TOFF$ se mantiene muy parecida entre las condiciones 1 y 2 (Figura 17 B, C). Asimismo, la $R_f A_i - TON$ entre las condiciones 2 y 3 presentó diferencias al realizar una prueba de comparación múltiple de Dunn ($p = 0.0081$), esto indica que le dan mayor importancia al TOFF que al TON (Figura 17 A).

Las víboras se sincronizan al ciclo térmico y se confirma ya que, al realizar una prueba de comparación múltiple de Dunn, se encontraron diferencias entre la $R_f A_f - TON$ de las condiciones 1 y 2 ($p = 0.0179$), pero no entre la $R_f A_i - TOFF$, indicando que las víboras se acoplan al ciclo térmico de 18 horas con actividad al final de la termofase. A pesar de que en la condición 3 se presenta actividad durante la termofase, ésta parece ser sincronizada por el ciclo L/O, ya que inician

su actividad muy cercana al apagado de la luz y la relación de fase entre el Ai – LOFF (Figura 15 A) es menor que entre el Ai -TOFF (Figura 17 C). Finalmente, en la condición 2, seis individuos presentaron un comportamiento parecido a un libre corrimiento en donde los primeros cinco días muestran un atraso de fase y los últimos cinco días un adelanto de fase (Figura 18).

9.3.2 Sincronización a la fotofase

En la condición 3, todas las víboras mostraron una sincronización al ciclo L/O, su actividad la iniciaron después del apagado de la luz, en promedio, tardaron de dos a tres días en que su actividad se encontrara en fase con el ciclo L/O (Figura 18). Para que las víboras estuvieran en fase con el apagado de la luz, algunas tuvieron que recorrer el inicio de su actividad desde siete hasta 10 horas, esto demuestra una gran fuerza sincronizadora del ciclo L/O (Figura 18). De igual forma, esta condición mostró mayor sincronía entre el Ai - LOFF que las condiciones de la etapa 1 con ciclos L/O (Figura 15 A). Lo que indica que, la interacción entre el estímulo fótico y térmico sincroniza con mayor precisión el ritmo de actividad.

En la condición 3, el Ai se presentó en promedio 0.68 horas antes de LOFF (Figura 15 A), solo la víbora 2 inicia su actividad 4.5 horas antes, es decir, a la mitad del fotoperiodo, siendo el mismo comportamiento que presenta en todas las condiciones con ciclos L/O. Asimismo, en la condición 3 el Af se presentó en promedio 1.15 horas antes de LON, y al realizar una prueba de comparación múltiple de Dunn, se encontraron diferencias entre las condiciones 2 y 3 en la Rf Af - TON ($p = 0.0373$) (Figura 17 B) demostrando una sincronización al ciclo L/O por encima del ciclo de temperatura, ya que inician su actividad antes del apagado de la luz y la finalizan antes del encendido (Figura 18).

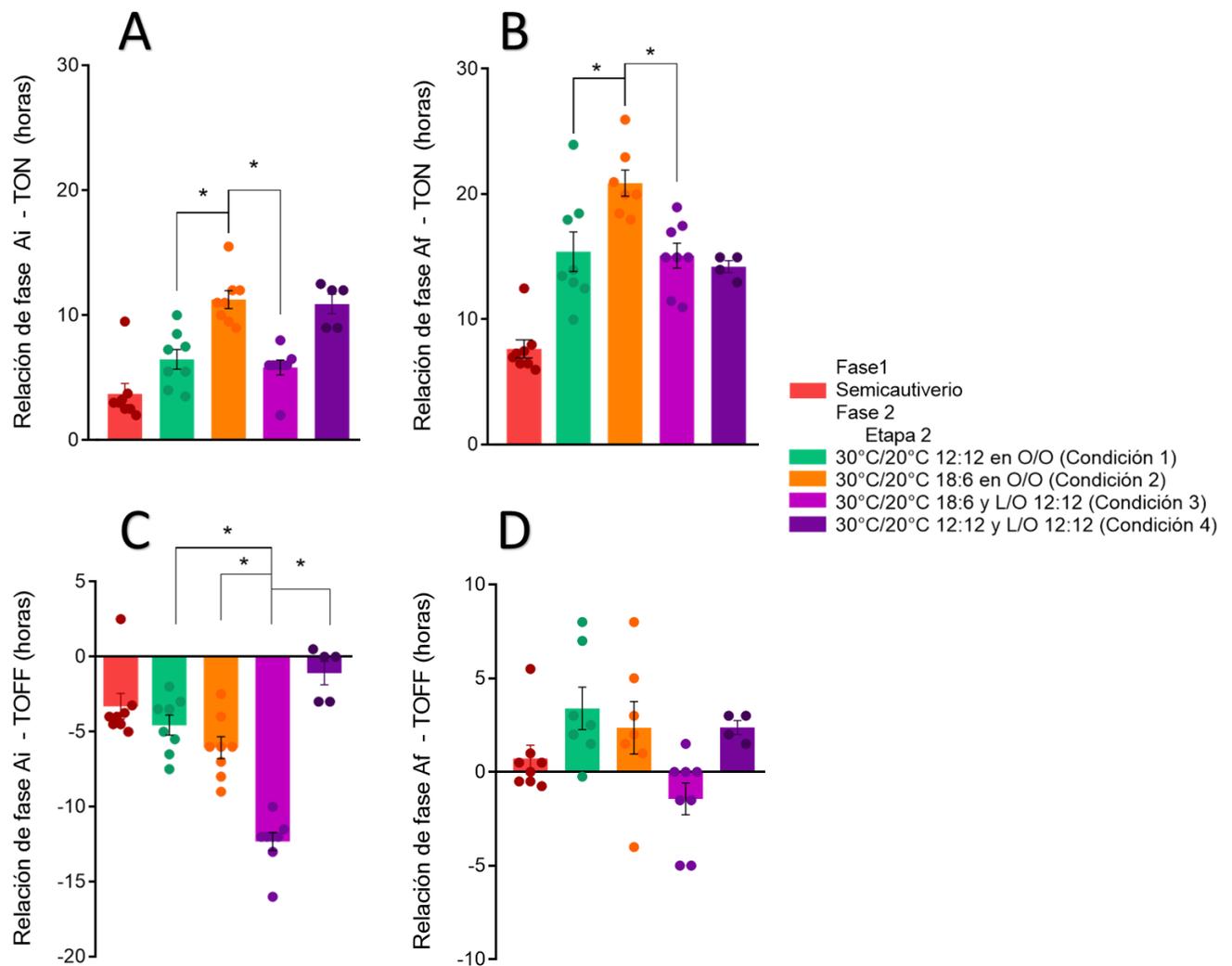


Figura 17. Relación de fase entre el Ai y Af con TON y TOFF. A. Relación de fase promedio del inicio de la actividad (Ai) comparado con el inicio de la termofase. B. Relación de fase promedio del fin de la actividad (Af) comparado con el inicio de la termofase. C. Relación de fase promedio del inicio de la actividad (Ai) comparado con el inicio del crioperiodo. D. Relación de fase promedio del fin de la actividad (Af) comparado con el inicio del crioperiodo. TON = Inicio de la termofase. TOFF = Inicio de la criofase. Las barras muestran medias +/- SEM. * = $p < 0.05$, post-hoc: Prueba de comparación múltiple de Dunn.

Las víboras sincronizaron su actividad al ciclo L/O al imponer el fotoperiodo en la condición 3, y presentaron un inicio de actividad de 12 horas antes de TOFF, mostrando diferencias significativas en la Rf Ai - TOFF con las condiciones 1 y 2 ($F_{5,8} = 31.95$, $p < 0.0001$) (Figura 17

C). Por último, en las condiciones 1 y 2 continúan su actividad después de iniciar la criofase; sin embargo, en la condición 3, detienen su actividad 1.4 horas antes del inicio de la criofase (Figura 17 D). Esto último, debido que presentan actividad durante la escotofase y detienen su actividad antes del encendido de la luz, momento en que inicia la criofase (Figura 18), demostrado una mayor fuerza de sincronización del ciclo L/O.

9.3.3 Condición 4 (Conflicto)

En la condición 4, las víboras se sincronizaron preferentemente al ciclo L/O y realizaron la mayor parte de su actividad durante la escotofase. Sin embargo, las víboras 1, 2, 4 y 8 expresaron un ritmo bimodal, al parecer con un componente circadiano asociado al ciclo térmico y otro asociado al ciclo L/O, no obstante, presentan mayor actividad durante la escotofase. Por otro lado, en las víboras 3, 5, 6 y 7 la sincronización al ciclo L/O es muy evidente. De estas últimas, las 5, 6 y 7 restringieron su actividad a la escotofase. Todas menos la 1 y la 2 disminuyeron la amplitud en su actividad considerablemente. En general, tardaron de dos a tres días en que su actividad estuviera en fase con el estímulo sincronizador, lo que elimina un posible enmascaramiento (Figura 19).

El promedio de actividad diario se vio reducido en comparación con las demás condiciones, presentado un α promedio diario de 2.21 horas (Figura 11). Asimismo, en esta condición se observa una modificación de la actividad en casi todas las víboras, por ejemplo, presentando un patrón bimodal o no mostrando un periodo de descanso (Figura 19).

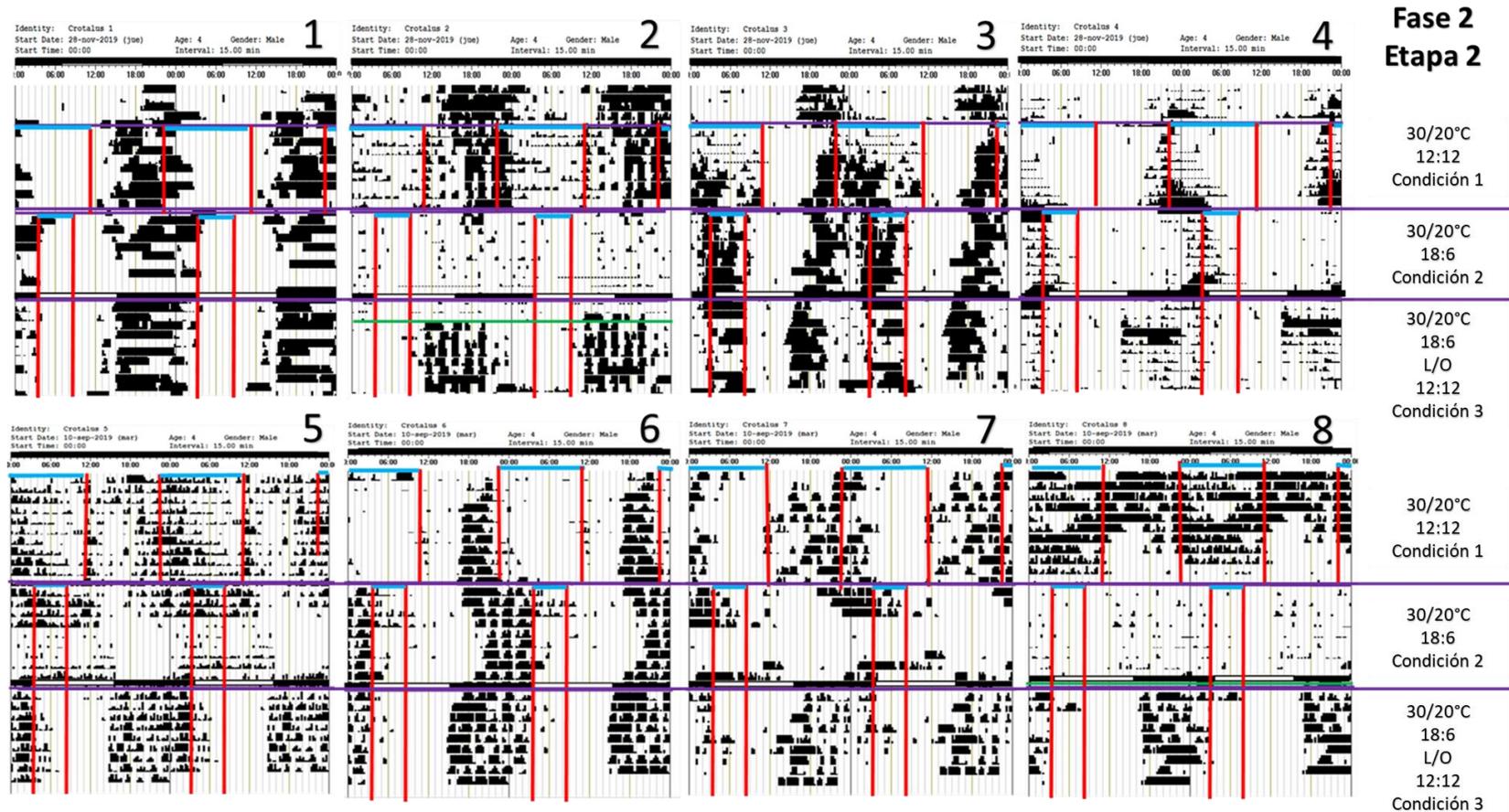


Figura 18. Actogramas en doble gráfica de las ocho víboras en la fase 2, etapa 2. Se observa una sincronización al ciclo de temperatura en los primeros dos experimentos, con actividad al final de la termofase y durante la criofase. Al pasar a la condición 3, se observa una sincronización en todas las víboras al ciclo de L/O con actividad durante la escotofase, con excepción de la víbora 2 que inicia su actividad a la mitad de la fotofase. Las barras negras continuas arriba de cada actograma representan la escotofase y las barras blancas y negras a la mitad de cada actograma representan la fotofase y la escotofase respectivamente. Las líneas azules entre las barras rojas indican el crioperiodo (20 °C). Las líneas moradas indican el cambio de condición. La línea verde en las víboras 2 y 8 indica el día en que se produce la ecdisis. Número de víbora indicado en la esquina superior derecha de cada actograma.

Para analizar el alpha de la condición 4, se compararon la condición 1 y la condición 2 por separado contra la condición 4. Al realizar una ANOVA de una vía no se encontraron diferencias entre la condición 4 y la etapa 1. Sin embargo, entre la condición 4 y la etapa 2 sí se encontró una diferencia ($F_{3,31} = 6.943$, $p = 0.0218$). Al realizar la prueba post hoc de Tukey se encontraron diferencias entre la condición 4 y la condición 1 ($p = 0.0019$) y la condición 3 ($p = 0.0161$). Esto podría indicar que las víboras tienen una gran capacidad de acoplarse a un gran intervalo de temperaturas y ciclos de L/O.

La actividad en la condición 4 disminuyó en seis de ocho organismos, a pesar de esto, el tiempo total que se mantuvieron activos aumentó considerablemente. Es decir, movían unos segundos la cabeza o solo se reacomodaban y se quedaban quietas y a los pocos minutos volvían a moverse unos segundos y se quedaban quietas de nuevo, repitiendo este patrón desde 9 hasta 23 horas en las víboras 7 y 8 (Figura 19). Este patrón de actividad podría indicar que los ciclos fóticos fuera de fase con los térmicos producen una competencia entre los sincronizadores y que, probablemente, los ritmos de actividad son controlados por una sola estructura sensible a cambios fóticos y térmicos.

Como ya se mencionó, algunas víboras presentaron un componente circadiano asociado al ciclo de temperatura y otras al ciclo L/O, debido a esto, para las víboras 1, 2, 3, 4 y 8 se calcularon, además de los A_i y A_f para el ciclo L/O, otros para el ciclo de temperatura. El A_i promedio para el ciclo L/O fue de 0.25 horas después de LOFF y el A_f promedio fue de 1.53 horas antes de LON (Figura 15). En cambio, el A_i promedio para el ciclo térmico fue de 1.1 horas antes de TOFF y el A_f promedio fue 2.9 horas después de TOFF (Figura 17 C). Al ser menor la relación de fase entre el $A_i - LOFF$ que el $A_i - TOFF$, se demuestra una mayor fuerza de sincronización del ciclo L/O que del ciclo térmico, con inicio de actividad al apagado de la luz y con anticipación al encendido de la luz (Figura 19).

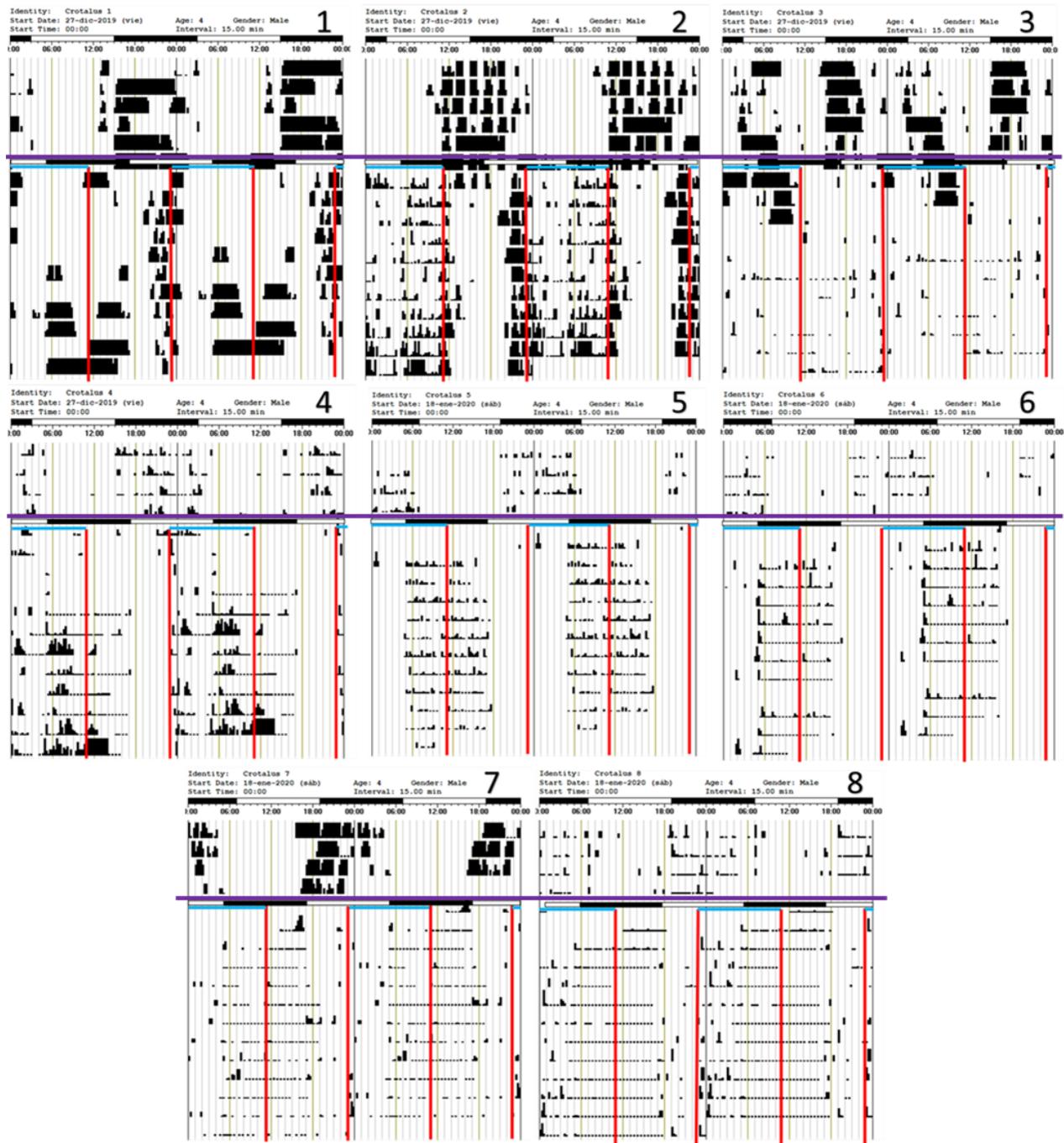


Figura 19. Actogramas en doble gráfica de las ocho víboras en la condición 4. Los primeros cinco días son los de aclimatación en condición L/O 12:12 y 30 °C, las barras moradas indican el cambio a la condición 4. Las víboras 1, 2, 4 y 8 muestran un ritmo bimodal, sincronizándose al ciclo de temperatura y al ciclo L/O. En las víboras 5, 6 y 7 se observa una sincronización al ciclo L/O, con actividad durante la escotofase. Las víboras 4 a 8 presentan una amplitud reducida en su actividad. Las barras negras representan la escotofase y las barras blancas la fotofase. Las líneas azules entre las barras rojas indican el crioperiodo (20 °C). Número de víbora indicado en la esquina superior derecha de cada actograma.

9.4 Ecdisis en varias serpientes durante los experimentos

Tres víboras llevaron a cabo el proceso de ecdisis durante el experimento y una cuarta lo inició, pero no lo completó durante la grabación. El proceso de ecdisis, modificó la actividad locomotriz considerablemente. Las víboras 2 y 8 mudaron durante la fase 2, etapa 2, en la condición 3, la víbora 5 durante la fase 2, etapa 1, durante la condición O/O y la víbora 3 mudó 10 días después de terminada la condición 4.

La víbora 8 inició el proceso de muda a las 22:30 horas del día 29 de septiembre y lo concluyó a las 00:35 horas del día 30 de septiembre, el mismo día de cambio de condición. El día de la muda, presentó actividad hasta la media noche, durante la escotofase, y al día siguiente, se detuvo al encendido de la luz, lo que significa que se sincronizó inmediatamente al ciclo de luz y oscuridad. Ese mismo día, mostró una actividad normal e inició su movimiento al apagado de la luz como las demás víboras (Figura 18). Veinte días antes de la muda mostró mucha actividad sin preferencia de horario, con un α promedio de 12.94 horas y un periodo circadiano de 22.17 horas (Anexos 1, 3). Once días antes de la muda no mostró ningún tipo de periodicidad y disminuyó su actividad hasta ser casi nula, con un α promedio de 0.65 horas diarias (Anexo 3). Veinticuatro horas después de que se produjo la ecdisis retomó una actividad normal con inicio de actividad al apagado de la luz, un α promedio de 5.21 horas y un periodo circadiano de 23.82 horas (Anexos 1, 3).

La víbora 2 mudó el 25 de diciembre, al cuarto día de iniciada la condición 3, inició el proceso de muda a las 11:00 horas y lo terminó a las 13:00 horas. Treinta días antes de la muda, en L/O 12:12 a 30 °C, previo a la condición 1, presenta un periodo circadiano y mucha actividad con un promedio de α de 9.09 horas, con inicio de movimiento a la mitad de la fotofase, como lo había hecho en las condiciones L/O 18:6 y L/O 12:12 de la etapa 1 (Figura 16). Al cambiar a la condición 1, 23 días antes de la muda, mantuvo esta elevada actividad y mostró un periodo de 24.27

horas (Anexo 1). El 13 de diciembre, durante la misma condición, 12 días antes de la muda, disminuyó su movimiento hasta tener un α promedio de 0.81 horas diarias, con un periodo circadiano de 24.12 horas. Esta baja actividad la mantuvo hasta el 25 de diciembre, cuando se produce la muda. Inmediatamente después de la muda mostró una actividad normal manteniendo un periodo circadiano de 24.15 horas (Anexo 1). De la misma forma en que se había comportado anteriormente, inició su actividad de seis a siete horas después del encendido de la luz o de una a dos horas después de iniciada la termofase (Figura 18).

La víbora 5 mudó el 11 de agosto, durante la fase 1, etapa 1, en la condición O/O a 30 °C, al sexto día de iniciada esa condición, inició el proceso de muda a las 16:00 y lo concluyó a las 18:30 horas. Durante la condición L/O 18:6 aparentemente está sincronizada al ciclo L/O; sin embargo, parece mostrar un adelanto de fase en su actividad, como si se encontrara en libre curso. Nueve días antes de la muda, el viernes 2 agosto, a los siete días de iniciada la condición L/O 18:6, disminuyó su actividad hasta mostrar un α promedio de 0.61 horas diarias y un periodo circadiano de 24.58 horas. Al cambiar de condición a O/O, continuó disminuyendo su actividad hasta mostrar un α de 0.53 horas promedio diarias hasta el día de la muda. Inmediatamente después de la muda mostró una actividad normal y un periodo circadiano de 25.21 horas (Anexo 1) en libre curso con atraso de fase hasta terminar la condición, con un α promedio diario de 3.9 horas. Al cambiar la condición a L/O 12:12 mostró una actividad parecida a las demás y se sincronizó al apagado de la luz (Figura 16) mostrando un periodo de 23.82 horas (Anexo 1).

La víbora 3 mudó el 15 de enero, 4 días después de terminar la condición 4, no se tienen registros en video después de terminado el experimento, pero desde el seis de diciembre (50 días antes de la muda) durante la condición 1, se observó un cambio en su comportamiento que pudo no ser debido a los periodos de luz y temperatura impuestos (Figura 19). Como en los tres casos anteriores, mostró un aumento en su actividad, desde un α promedio de 4 horas diarias a 6.26

horas 50 días antes de la muda, 9.05 horas de 44 a 34 días antes y 7.51 horas de 34 a 22 días antes. Asimismo, presentó un patrón bimodal en su actividad durante las condiciones 2 y 3 que se fue haciendo más evidente conforme pasaba el tiempo (Figura 18). Finalmente, a los tres días de iniciada la condición 4 (15 días antes de la muda), de presentar un α promedio de 5.82 horas, disminuyó hasta 0.58 horas diarias, muy parecido a las demás víboras que mudaron. Es interesante mencionar que los primeros tres días de la condición 4 muestra una sincronización al ciclo fótico iniciando su actividad al apagado de la luz y al cuarto día se perdió esta sincronización y su actividad se vuelve dispersa sin ninguna preferencia de horario (Figura 19).

10 DISCUSIÓN

10.1 Ritmo en semicautiverio

En condición de semicautiverio las víboras presentaron un ritmo circadiano en su actividad locomotriz. De igual manera, se han encontrado ritmos de actividad con periodos cercanos a 24 horas en el género *Bothrops* en condiciones de semicautiverio (Stuginski *et al.*, 2012). En *C. molossus*, siete de ocho víboras presentaron actividad diurna con una fuerte correlación con la temperatura ambiental alta, lo que indica que prefieren realizar su actividad durante las horas de luz y con una temperatura mayor a los 20 °C. La única que presentó actividad nocturna, la inicia al ocultarse el sol y con una temperatura ambiental de 16°C en promedio, la cual es todavía aceptable para realizar su actividad (Beck, 1995; García y Güizado, 2008; Bovo *et al.*, 2012).

En este estudio las víboras iniciaron su actividad cuando la temperatura ambiental se encontraba por encima de los 21 °C y se mantuvieron inactivas cuando la temperatura se encontró por debajo de los 17 °C. Este intervalo de temperatura, junto con los estudios en la zona centro de México (Lemos-Espinal *et al.*, 1997; García y Güizado, 2008; Jaramillo-Alba *et al.*, 2020), nos indican una temperatura base en la cual individuos del género *Crotalus* se pueden encontrar activos. Asimismo, *C. molossus* se mostró activa durante la fotofase, por lo que se puede asumir que en los meses de junio y julio presenta una actividad diurna, como se ha reportado para el Pedregal de San Ángel en época de verano (Balderas-Valdivia *et al.*, 2009).

La actividad de *C. molossus* se correlacionó con la temperatura ambiental pero no con la irradiancia. Esto significa que, durante las horas más brillantes del día no presentan mucho movimiento. En vida libre, la temperatura influye más que la luz en la actividad de las víboras de cascabel. Esto se hace evidente al analizar el patrón de actividad diario. Los máximos de actividad se registraron desde las 14:30 hasta las 16:30 horas, cuando los niveles de irradiancia se encontraban por debajo de la media, y la temperatura dentro de su máximo. Por ejemplo, en

Crotalus cerastes en vida libre en el Desierto de Mohave, California, se describió un patrón de actividad similar, al realizar su actividad en las primeras y en las últimas horas del día, resguardándose durante las horas más brillantes (Clark *et al.*, 2016). De la misma manera, se ha descrito este patrón de actividad para las especies *C. molossus*, *C. tigris* y *C. atrox* en el desierto de Sonora (Beck, 1995).

En semicautiverio, la relación de fase entre Ai-TON fue menor que la de Ai-LON indicando que la temperatura influye más que la luz para realizar su actividad. Esto se hace evidente al analizar los resultados con termo ciclos en oscuridad constante de la fase 2, en donde la actividad la realizan durante la termofase, y se sincronizan al ciclo térmico (Figura 18). Asimismo, en la etapa 1, con ciclos L/O a temperatura constante, las víboras prefirieron realizar su actividad durante la escotofase. Esto es importante ya que, a excepción de una víbora, todas modificaron su actividad de diurna en semicautiverio a nocturna en cautiverio. Esto quiere decir que, dada una temperatura ambiental óptima, las víboras realizan su actividad durante la fase oscura. De la misma manera, la relación de fase en semicautiverio entre Af y LOFF y TOFF, indica que se anticipan al ocaso (apagado de la luz) y a las temperaturas bajas, ya que cesan su actividad antes de la puesta del sol y poco después de rebasar el umbral de los 20 °C.

El patrón conductual de presentar dos momentos de actividad durante el día, uno con poco movimiento al asolearse y el otro, después de algunas horas, con actividad más intensa, es parecido con lo que reporta Beck (1995) en las especies *C. molossus*, *C. atrox* y *C. tigris* en el desierto de Sonora. De manera similar, en *Crotalus cerastes* en el Desierto de Mohave, California, durante la época cálida, se encontró un patrón diario de actividad nocturno; en el cual las víboras salían de sus refugios desde una hora antes a una hora después del ocaso y se ocultaban de una a dos horas después de la salida del sol (Clark *et al.*, 2016). Esto indica que, durante la época cálida, los individuos de *Crotalus* en el norte del país, realizan su actividad desde antes del atardecer, hasta

poco después del amanecer. En cambio, al parecer las víboras del centro del país, presentan su actividad desde el mediodía hacia la tarde (Balderas Valdivia *et al.*, 2009), debido principalmente a la temperatura ambiental. Este patrón de actividad dependiente de un gradiente térmico para el movimiento, indica que es una especie termo-reguladora activa y no termo-conformista pasiva (Daltry *et al.*, 1998). Es decir, que mediante su conducta modifica su temperatura corporal al desplazarse de zonas frías a cálidas y viceversa, manteniendo una temperatura corporal adecuada para su actividad.

En este estudio la temperatura y la humedad presentaron una correlación muy fuerte y el efecto de la humedad en la actividad puede estar determinado por la temperatura. A pesar del alto grado de correlación de la humedad con el movimiento de *C. molossus*, la humedad relativa aparentemente no es un factor decisivo para la actividad, debido a que el pico de actividad fue en el momento con menor humedad relativa. Sin embargo, puede ser un efecto de la correspondencia inversa entre la humedad y la temperatura. Otro factor importante puede ser la precipitación; en este caso, no se puede asumir que la lluvia ligera (0.29 mm de agua en días de lluvia) modifique el movimiento de esta especie, debido a que no hubo una alteración en la actividad de los organismos en los días que llovió mientras éstos realizaban su actividad. Por otro lado, en la mayoría de días que se presentó lluvia, esta sucedió después de las 19 horas, momento en que las víboras ya habían cesado su actividad. Del mismo modo, la actividad nocturna que mantuvo la víbora 1, fue antes, durante y después de las lluvias, lo que refuerza la idea de que la lluvia ligera no modifica el comportamiento de esta especie. Es necesario realizar experimentos en semicautiverio en las diferentes estaciones para confirmar si la humedad ambiental o la precipitación afectan el comportamiento de estos organismos.

Los resultados de este estudio parecen indicar que, en condiciones de vida libre, la temperatura es más importante que la luz para controlar la actividad de *C. molossus*. Sin embargo,

no se puede excluir que factores, como la humedad o la precipitación, o una combinación de ellos influyan en la actividad de estos organismos. Otros factores pueden ser la dieta o hábitos de caza, así como actividad específica de machos y hembras en la época reproductiva. Se necesitan realizar estudios ecológicos en esta especie para esclarecer el efecto de los diferentes factores bióticos y abióticos en la conducta entre sexos, juveniles y adultos, épocas vitales y ambientes.

10.2 Ritmo en cautiverio

Se confirma la presencia de un ritmo circadiano en la especie *Crotalus molossus* debido a que en libre curso siete de ocho víboras mostraron un periodo cercano a 24 horas, comprobando que este ritmo es controlado por un marcapasos endógeno. Este periodo circadiano se mantuvo en las diferentes condiciones térmicas y en la condición 4, cuando los sincronizadores luz y temperatura se encontraron desfazados. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en estudios previos con *Bothrops jararacussu* y *C. molossus* en cautiverio que presentaron un periodo circadiano en diferentes condiciones lumínicas y en libre curso (Pereira Da Cruz, 2007; Pereira Da Cruz *et al.*, 2008a; Villarreal-Medina, 2018). De todas, solo una víbora no presentó ritmo de actividad en condición de oscuridad constante, pero al volver a la condición de L/O 12:12 retomó el periodo circadiano mostrando poca actividad. Esta aparente inhibición del ritmo probablemente sea debido a variación individual ya que esta víbora no se encontraba en proceso de muda y se había alimentado igual que los demás individuos, no se descarta una posible enfermedad. De forma semejante, estudios en la boa *Eryx conicus*, del sur de Asia y con el vipérido *Bothrops jararacussu* de Brasil, reportan situaciones similares, en que uno o varios individuos presentan poca actividad sin un ritmo aparente al cambiar a condiciones de oscuridad constante (Griffiths, 1984; Pereira Da Cruz, 2008a).

Se comprobó que la luz es un fuerte sincronizador para el ritmo de actividad ya que todas las víboras se sincronizaron al ciclo L/O 18:6 mostrando actividad en la escotofase y se resincronizaron al cambiar de O/O a la condición de L/O 12:12. De la misma forma, se determinó que la temperatura es un buen sincronizador cuando no se presentan ciclos de luz, ya que, en las condiciones de termo ciclos en oscuridad constante, las víboras realizaron su actividad al final de la termofase. Sin embargo, al estar expuestas a ambos sincronizadores, en la condición 3 y 4, se sincronizaron al ciclo de L/O y realizaron su actividad durante la escotofase. Este comportamiento de modificar su actividad y sincronizarse a ciclos de L/O cuando ya se encontraban sincronizados a ciclos de temperatura parece indicar que la luz tiene prioridad como sincronizador para la actividad locomotriz en esta especie.

Pittendrigh (1960) propuso el modelo de dos osciladores, el cual explica la interacción entre los ciclos de luz y oscuridad y los ciclos térmicos. Pittendrigh y Daan (1976) plantearon que dos osciladores separados controlan la fase del inicio de actividad (A_i) y del fin de actividad (A_f), y que un cambio en la relación de fase entre los dos osciladores produce cambios en α . Un oscilador (A_i) puede estar sincronizado a alguna parte del ciclo de temperatura o al de L/O, mientras que el segundo oscilador (A_f) puede estar sincronizado a otra parte del ciclo de temperatura o al de L/O. Al analizar la relación de fase entre A_i - LOFF y A_f - LON en el presente estudio, se observa que los ritmos de actividad locomotriz se sincronizan al ciclo L/O con actividad durante la escotofase, ya que muestran una anticipación al apagado de la luz para iniciar su actividad y una anticipación al encendido para terminarla (Figura 15). Otra evidencia de que la luz es un fuerte sincronizador para la actividad locomotriz, inclusive más importante que la temperatura, es que, la relación de fase entre A_f - LON no presentó diferencias entre las condiciones, ya que en las condiciones que tienen fotoperiodo, las víboras terminaron su actividad poco antes de que se encendieran las luces (Figura 15 B). Es interesante que en L/O 12:12 presentaran una relación de

fase Af – LON mayor que en los demás experimentos. Esto puede deberse a que mantienen la misma actividad que en la condición anterior (L/O 18:6) y tarden más de 10 días en acostumbrarse al nuevo ciclo fótico, es decir que los efectos de la condición anterior hayan afectado su actividad. Asimismo, la relación de fase Ai – LOFF de L/O 18:6 es mayor que en los demás experimentos y fue la que presentó mayor variación, lo que puede indicar que un fotoperiodo con 18 horas de luz se encuentra cerca del límite para sincronizar su actividad.

La relación de fase entre Ai - TON en las condiciones 1 y 2 comprueba una verdadera sincronización con la termofase, y no un enmascaramiento, debido a que previo a estas condiciones se encontraban en libre curso y al imponer el termoperiodo se sincronizaron de la manera esperada. Sin embargo, en la condición 2, al aumentar el ciclo térmico a 18 horas, seis individuos presentaron un comportamiento parecido a un libre corrimiento en donde los primeros cinco días muestran un atraso de fase y los últimos cinco días un adelanto de fase (Figura 18). Esto parece indicar que los ciclos térmicos no tienen tanta fuerza como sincronizador sobre la actividad de las víboras como los ciclos de L/O, ya que en ninguna condición con ciclo de L/O sucede este fenómeno. Sin embargo, en la condición 2, al aumentar seis horas la duración de la termofase, el Ai - TON también aumentó, al mostrar diferencia con respecto a la condición 1, demuestra que las víboras siguen el ciclo térmico (Figura 17 A). Corroborando esto, mantuvieron una relación de fase entre Ai - TOFF muy cercana, comprobando que se sincronizan a la termofase, anticipándose a la criofase (Figura 17 C). Es importante mencionar que en las condiciones 1 y 2, la actividad se recorre hacia el final de la termofase, lo que indica que, no importando la duración del termoperiodo, las víboras realizan su actividad anticipándose al cambio a la criofase. Esto puede deberse a que al ser organismos adultos y estén más acostumbrados a realizar su actividad durante la noche (Balderas Valdivia *et al.*, 2009; SEMARNAT, 2018), el que no existan pistas visuales como la luz (e.g. crepúsculo) el cambio de temperatura les indique la transición a la fase nocturna. Es necesario realizar estudios

con organismos juveniles para verificar si esta conducta se mantiene o si realizan su actividad en diferente momento.

En las condiciones 1 y 2, las víboras se sincronizaron al ciclo térmico anticipándose a la criofase, debido a esto, al imponer un fotoperiodo en la condición 3 se esperaría que, si la temperatura es un sincronizador de mayor prioridad con respecto a la luz, el Ai se mantuviera igual que en la condición 2; sin embargo, esto no sucedió y las víboras se sincronizaron al ciclo L/O, con actividad durante la escotofase (Figura 15). Así mismo, en la condición 3, las víboras se sincronizaron más eficientemente al ciclo L/O, con anticipación a la escotofase (Figura 15). Esta respuesta puede deberse a que el ciclo L/O se encuentra en fase con el ciclo de temperatura (i.e. la criofase inicia con la fotofase), y la escotofase inicia durante la termofase, por lo que se ajustó de manera más efectiva. Resultados semejantes obtuvieron Ellis *et al.* (2009) con *Tiliqua rugosa* al colocar a las lagartijas en ciclos de L/O 12:12 en fase con ciclos de alta y baja temperatura 12:12. De la misma manera, en la condición 4, se aprecia una relación de fase entre Ai - LOFF menor que en la condición 3, que indica una sincronización más efectiva, lo que resulta interesante ya que se encontraban a la mitad de la criofase (~20 °C), indicando que se sincronizan incluso a bajas temperaturas. Asimismo, en la condición 3 y 4, la relación de fase entre Af - LON es menor que en los demás experimentos, lo que indica que terminaron su actividad muy cercana al encendido de la luz. Esto puede deberse a que, en ambas condiciones, al final de la escotofase se encontraban a 30 °C, por lo que utilizaron todo el tiempo disponible en oscuridad con temperatura elevada para realizar su actividad.

En dos estudios distintos, al presentar ciclos térmicos y fóticos fuera de fase, cada vez más distanciados entre sí, las lagartijas *C. variegatus*, y *X. henshawi* ambas de California, EUA presentaron patrones de actividad que demuestran una interacción entre los dos zeitgebers (Evans, 1966; Lee, 1974). Asimismo, al exponer a la tortuga de clima frío *C. picta* de Rhode Island, EUA

a ciclos de luz y temperatura en antifase, ésta perdió sincronía con el termoperiodo y brincó de fase para sincronizarse al ciclo L/O (Graham y Hutchison, 1978). Un comportamiento parecido se observó en la condición 3, cuando al agregar el fotoperiodo, las víboras desplazaron su actividad para encontrarse en fase con el ciclo fótico y realizar su actividad durante la escotofase (Figura 18). Asimismo, en la condición 4, se observó esta interacción entre los dos zeitgebers, ya que se presentó actividad bimodal en cinco víboras, con actividad al final de la termofase y al inicio de la escotofase (Figura 19).

Evans (1966) mencionó que se esperaba un cambio abrupto en la actividad, si esta es regulada mediante la interacción de un sistema de osciladores sensibles a la luz y otros sensibles a temperatura. Eso sucedió en la condición 4, en donde la duración de α disminuyó y fue la única en mostrar diferencias, contra las condiciones 1 y 3. De la misma forma, Underwood (1992) planteó que se pueden producir cambios en la relación de fase entre los dos osciladores y por consiguiente en la expresión del ritmo de actividad si se producen cambios en la temperatura ambiental o en el fotoperiodo; por ejemplo, la actividad bimodal que se presentó en la condición 4. Estos datos proveen evidencia de que existen osciladores foto y termo sensibles controlando el inicio y el fin de la actividad en esta especie. Posiblemente se trate de una sola estructura neuronal que esté regulando los dos estímulos como sincronizadores o que una estructura, influenciada por la luz, regule a otra, influenciada por temperatura o viceversa. Se sabe que el sistema circadiano de los reptiles es multioscilandor, y que el ritmo de temperatura corporal puede ser independiente del de actividad locomotriz (Bartell *et al.*, 2004; Tosini *et al.*, 2001), por lo tanto, es posible que existan dos osciladores, uno para cada estímulo.

Hasta ahora se desconoce la duración de α en *C. molossus* y otras víboras en estado libre, sólo se cuenta con datos de víboras criadas en cautiverio. Así, la actividad promedio diaria que presentaron en semicautiverio desde 3.15 hasta 4.72 horas es comparable con los promedios

obtenidos por Stuginski *et al.* (2012) en el vipérido tropical *B. moojeni* del Instituto Butantan, Sao Paulo, Brasil, de 4.2 horas en L/O 12:12 y los realizados en *C. molossus* del semi desierto de Querétaro, por Villarreal-Medina (2018) de 2.5 horas en L/O 12:12 y 4.25 horas en O/O. Es importante destacar, que la duración de alpha fue semejante en todos los experimentos, lo que indica una flexibilidad en el sistema circadiano para acoplarse a distintas condiciones de luz y temperatura. La única condición que mostro diferencias significativas en la duración de alpha fue la condición 4, lo cual era esperado, ya que en los estudios en donde la luz y la temperatura se encuentran fuera de fase, se reduce la actividad de los organismos (Evans, 1966; Lee, 1974; Graham y Hutchinson, 1978).

Los resultados de este estudio indican que la temperatura es un factor importante para la actividad locomotriz de *C. molossus* en vida libre, ya que, en las condiciones 1 y 2, las víboras se sincronizaron al ciclo térmico y realizaron su actividad durante la termofase; sin embargo, la luz probó ser un sincronizador más efectivo para la actividad cuando se aplicó bajo condiciones controladas. La importancia de los ciclos térmicos sobre la actividad se sustenta en que, en los meses de mayor temperatura las poblaciones del norte del país, presentan un patrón bimodal para evitar el sobrecalentamiento y en meses fríos hibernan (Beck, 1995). Por el contrario, en poblaciones de clima más templado o de montaña, como las del centro del país, donde la temperatura no es tan extrema, presentan una actividad unimodal; sin embargo, también exhiben un periodo de hibernación (Balderas Valdivia *et al.*, 2009; Jaramillo-Alba *et al.*, 2020). Esta conducta indica un patrón flexible en su actividad dirigido por la temperatura ambiental, demostrando una capacidad de cambio de hábito dependiente de la temperatura ambiental, como hipotetizaron Tozetti *et al.*, (2009) para el género *Crotalus*. Análogamente, varios estudios en lagartijas y serpientes, demuestran que la actividad locomotriz se encuentra limitada por altas y

bajas temperaturas ambientales (Firth y Belan, 1998; Hardy y Greene, 1999; Foà y Bertolucci, 2001; Greene *et al.*, 2002; Ellis *et al.*, 2008).

En el Pedregal de San Angel durante el invierno, a causa de bajas temperaturas, *Crotalus molossus* entra en un estado de torpor, y se oculta en madrigueras, cuevas u oquedades (Campbell y Lamar, 2004; Balderas Valdivia *et al.*, 2009; SEMARNAT, 2018), en donde puede no estar expuesta a un fotoperiodo completo o a los cambios de intensidad de luz en el ambiente que se utilizan para medir el fotoperiodo. Debido a esto, los cambios diarios en el ciclo térmico, pueden ser utilizados por las víboras cuando la señal fótica no es un buen predictor de los cambios estacionales en el clima. Esto evidencia la importancia del termoperiodo, ya que, si la temperatura ambiental no supera un umbral, al parecer, la actividad no se inicia. Las especies que habitan en altas latitudes, dependen en gran medida de los cambios en el fotoperiodo para realizar su actividad (Rismiller y Heldmaier, 1988; Shine y Madsen, 1996; Grimm *et al.*, 2014), debido a que estos cambios se encuentran asociados a modificaciones en la temperatura ambiental, es probable que *C. molossus* utilice ambos estímulos, la luz y la temperatura, como señales para regular su ritmo de actividad locomotriz. Sin embargo, el que se haya sincronizado a los ciclos de temperatura en oscuridad constante, indica que la capacidad de los ciclos térmicos como sincronizadores de la actividad locomotriz en vertebrados poiquiloterms, debe ser estudiada más a fondo. Asimismo, la eficacia y rapidez con que *C. molossus* se sincronizó tanto al ciclo L/O como al ciclo térmico, prueba que puede ajustar su ritmo de actividad rápidamente para adaptarse a cambios inesperados en el ambiente; por ejemplo, se ha encontrado a *C. molossus* activa en vida libre durante el invierno tras varios días soleados, lo que se entiende como días más cálidos (Balderas Valdivia *et al.*, 2009). La capacidad para responder rápidamente a cambios climáticos le proporciona a esta especie una ventaja en un ambiente impredecible y le permite consumir recursos que no estarían disponibles a organismos que solo se sincronizan a señales fóticas o térmicas.

En síntesis, la actividad locomotriz de *C. molossus* es el resultado de la interacción entre el marcapasos circadiano que controla el ritmo de actividad y los ciclos de L/O y de temperatura. Finalmente, en términos de Lee (1974), “los calificativos de diurna, nocturna y crepuscular pueden ser aplicados solamente con referencia a componentes específicos del comportamiento”. En términos de actividad locomotriz, *C. molossus* es nocturna; en cuanto exposición, es decir, el momento del día en que sale, depende de las condiciones ambientales, principalmente de la temperatura.

10.3 Efectos del proceso de ecdisis sobre la actividad en *Crotalus molossus*

El proceso de ecdisis alteró de manera significativa la actividad de las víboras y fue diferente dependiendo cada individuo; sin embargo, en todas se distingue un patrón: la actividad aumenta 20 días antes de la muda y disminuye 10 días antes. Por lo menos en un individuo se observó una modificación en su actividad 40 días antes de la ecdisis. En tres víboras, 20 días previos a la muda se observó un aumento en la actividad, mostrando en promedio 9.9 horas diarias, y una modificación al periodo del ritmo, ya sea aumentando o disminuyendo (Anexo 1). Asimismo, en todas las víboras, diez días antes de la muda, desaparece el ritmo de actividad y disminuye su actividad (alpha) hasta ser casi nula, presentando en promedio una actividad de 0.64 horas diarias. El proceso de muda tuvo una duración promedio de 2.16 horas (desde que inicia a desprenderse la piel hasta que sale la cola). Esta duración puede estar sobreestimada a condiciones naturales ya que para auxiliarse durante este proceso, las víboras no contaron con ningún elemento más que su propio cuerpo y las paredes del encierro.

Dependiendo en qué momento del ciclo de temperatura o de L/O se encontraban al momento de finalizar la ecdisis, las víboras retomaron una actividad “normal” máximo 24 horas

después ya sea en libre curso o sincronizándose al estímulo dominante en cuestión. Al finalizar el proceso, todas mostraron un periodo circadiano y un α parecido al de los demás organismos. El sincronizarse tan rápido al estímulo indica una gran capacidad del sistema circadiano para responder a los factores ambientales. De igual forma, se puede asumir que las víboras se encuentran sincronizadas al estímulo, pero no se mueven debido a la situación vulnerable en que se encuentran y que al terminar el proceso simplemente retoman su actividad normal. Se puede considerar que el proceso de ecdisis produce un enmascaramiento ya que la actividad aumenta 20 días antes de la muda y disminuye 10 días antes y al finalizar la muda, inmediatamente retoman la fase y el periodo impuestos por el sincronizador.

11 CONCLUSIONES

El presente estudio arroja luz sobre la influencia de los ciclos fóticos y térmicos sobre la actividad locomotriz de los reptiles, en especial de las serpientes y en concreto en la especie *Crotalus molossus*. Se comprobó que esta especie presenta un ritmo circadiano en su actividad locomotriz y este se puede sincronizar tanto a ciclos de luz y oscuridad como a ciclos de temperatura. La temperatura es un buen sincronizador cuando no existen señales fóticas, y la luz es un sincronizador más efectivo para la actividad cuando se aplica bajo condiciones controladas. Finalmente, la actividad locomotriz de *C. molossus* es el resultado de la interacción entre los ciclos de L/O, ciclos de temperatura y el marcapasos circadiano que controla ese ritmo.

Los zeitgebers fóticos y térmicos interactúan entre sí y modifican los niveles de actividad, así como las fases de inicio y término de ésta. Ambos ciclos, fóticos y térmicos, pueden actuar como zeitgeber para la actividad locomotriz, pero, el exponer a las víboras a una termofase en el momento correcto del ciclo L/O sincroniza de manera más efectiva esta actividad y, en términos prácticos, la restringe al mejor momento del día. De la misma manera, los resultados de este estudio indican que existen osciladores foto- y termo - sensibles controlando la actividad en esta especie. Estos osciladores pueden ser dos estructuras, una que responda al estímulo fótico y otro al térmico o puede tratarse de una sola estructura neuronal que esté regulando los dos estímulos como sincronizadores. Se requieren de estudios que profundicen en las estructuras neurales que actúan como marcapasos circadianos en serpientes.

Los individuos del género *Crotalus* habitan una gran variedad de climas; y en algunos, las señales fotoperiódicas no siempre corresponden con las condiciones climáticas (e.g. térmicas) que uno esperaría. Debido a esto, el sistema circadiano del género *Crotalus* es sensible a ciclos térmicos y esto le confiere una ventaja al detectar modificaciones ambientales cuando las señales fóticas no

son precisas. A pesar de que este género se encuentra ampliamente distribuido y altamente diversificado, la información sobre ritmos de actividad diaria y los efectos de los varios factores que influyen su actividad, está disponible solo para unas pocas especies. Debido a esto, es necesario realizar experimentos con organismos de diferentes áreas de distribución para observar si muestran los mismos patrones de comportamiento. Asimismo, *Crotalus molossus* es un organismo de poca actividad y en general bien delimitada temporalmente, esto, aunado a la rapidez con que se sincroniza a los distintos estímulos permite realizar experimentos más elaborados o modificando otras variables.

La actividad de *Crotalus molossus* parece estar determinada por factores tanto bióticos como abióticos y los datos disponibles sugieren que presentan hábitos diurnos, nocturnos y crepusculares, así como rastreros y semi-arbóreos, con una dieta variada, que incluye animales diurnos y nocturnos. Los resultados de este estudio demuestran que en semicautiverio presentan actividad diurna, durante la parte cálida del día, y, en cautiverio a temperatura constante, actividad nocturna, esto indica que su actividad está regulada principalmente por la temperatura ambiental y puede modificarla dependiendo de este factor; sin embargo, al presentarle ciclos de L/O, realizan su actividad durante la escotofase. En pocas palabras, en términos de actividad locomotriz, *C. molossus* es nocturna; en cuanto exposición, es decir, el momento del día en que sale, depende de las condiciones ambientales, principalmente de la temperatura.

12 ANEXOS

ANEXO 1

Cuadro 3. Periodos de actividad en horas de las víboras en los experimentos (alpha= 0.05).

NR = No se realizó, * = En proceso de muda, + = No significativo.

Condición / Serpiente	FASE 1	FASE 2, ETAPA 1			FASE 2, ETAPA 2				
	Semicautiverio	L/O 18:6	O/O	L/O 12:12	30/20 °C 12:12 O/O	30/20 °C 18:6 O/O	Repetición 30/20 °C 18:6 O/O	30/20 °C 18:6 L/O 12:12	Conflicto
	Periodo (horas)	Periodo (horas)	Periodo (horas)	Periodo (horas)	Periodo (horas)	Periodo (horas)	Periodo (horas)	Periodo (horas)	Periodo (horas)
1	23.67	24.12	23.24	24.74	23.97	23.82	NR	23.97	25.88
2	23.97	24.12	23.39	24.43	24.27	24.12*	NR	24.15	11.98/ 24.82
3	24.27	23.97	23.24	24.27	24.27	23.97*	NR	12.02/ 26.87*	25.51*
4	23.97	23.97	-	24.74	24.12	24.27	NR	23.44	24.97
5	23.67	23.39*	25.21*	23.82	24.58	24.58	23.97	23.97	24.21
6	23.82	23.82	24.43	23.67	23.82	24.43	24.27	23.82	23.52
7	23.10	23.82	22.69	24.58	23.67	24.9	23.53	23.53	20.61
8	23.24	24.12	23.10	24.74	22.17*	25.20*+	23.67	23.82	22.98
9	23.82	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

ANEXO 2

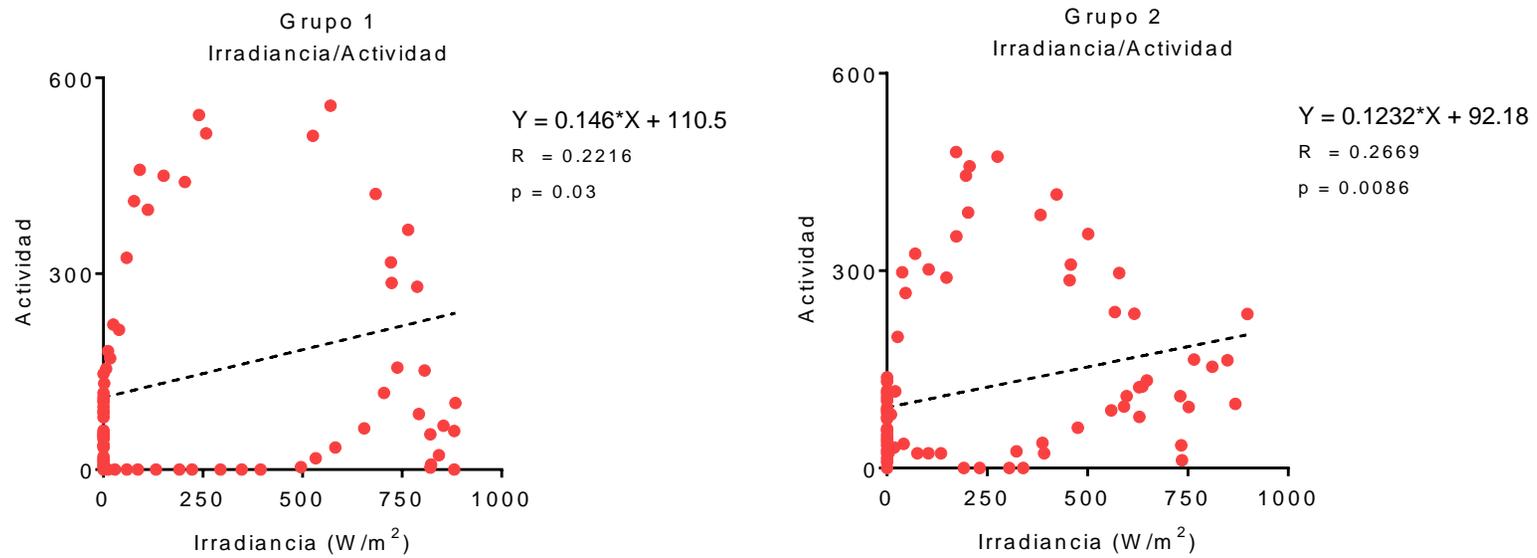


Figura 20. Regresión lineal entre la actividad registrada de las víboras (en segundos) en condición semicautiverio y la irradiancia en los encierros de semicautiverio.

ANEXO 3

Cuadro 4. Promedio diario de alpha en horas de las víboras en los experimentos.

NR = No se realizó, * = En proceso de muda

Condición / Serpiente	FASE 1	FASE 2, ETAPA 1			FASE 2, ETAPA 2				
	Semicautiverio	L/O 18:6	O/O	L/O 12:12	30/20 °C 12:12 O/O	30/20 °C 18:6 O/O	Repetición 30/20 °C 18:6 O/O	30/20 °C 18:6 L/O 12:12	Conflicto
1	3.15	5.84	3.48	2.39	7.72	5.52	NR	7.24	5.03
2	3.64	5.21	5.94	6.37	7.78	1.12*	NR	4.7	5.31
3	3.42	4.28	3.07	2.79	6.26	9.05*	NR	7.51	2.01
4	4.41	3.9	0.12	0.65	2.38	2.36	NR	3.07	1.84
5	3.37	1.99	2.22	4.72	5.93	4.28	5.31	5.9	1.07
6	4.72	3.93	5.67	7.85	3.56	6.3	6.96	7.05	0.83
7	0.73	3.68	3.52	3.86	5.87	4.32	3.91	4.8	0.79
8	3.74	4.15	4.08	3.26	5.28	0.65*	9.03*	5.21	0.87

13 REFERENCIAS

- Aschoff, J. (1981). Handbook of behavioral neurobiology. Volume 4, Biological Rhythms. Plenum Press, New York.
- Allemand, R., Boistel, R., Daghfous, G., Blanchet, Z., Cornette, R., Bardet, N., Vincent P., Houssaye, A. (2017). Comparative morphology of snake (Squamata) endocasts: evidence of phylogenetic and ecological signals. *Journal of anatomy*, 231(6), 849-868.
- Anderson, C. G., Greenbaum, E. (2012). Phylogeography of northern populations of the black-tailed rattlesnake (*Crotalus molossus*, Baird and Girard, 1853), with the revalidation of *C. ornatus* Hallowell, 1854. *Herpetological Monographs*, 26(1), 19-57.
- Arnaud, G., Sandoval, S., Escobar-Flores, J. G., Gomez-Muñoz, V. M., Burguete, J. L. (2018). Thermal ecology of the Rattlesnake *Crotalus catalinensis* from Santa Catalina Island, Gulf of California. *Acta Universitaria*, 28 (6), 39-46.
- Armstrong, B.L., Murphy, J.B. (1979). The natural history of Mexican rattlesnakes. University of Kansas of the Museum of Natural History, Special Publications, 5: 1-88.
- Balderas-Valdivia, C.J., Barreto-Oble, D., Madrid-Sotelo, C.A. (2009). Contribución a la historia natural de *Crotalus molossus*. En: A. Lot y Z. Cano-Santana (Eds.) Biodiversidad del Pedregal de San Ángel. UNAM, Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y Coordinación de la Investigación Científica, D.F. México. Pp. 363-369.
- Bartell, P., Miranda-Anaya, M., Menaker, M. (2004). Period and phase control in a multioscillatory circadian system (Iguana iguana). *Journal of Biological Rhythms* 19:47-57
- Beck, D. (1995). Ecology and energetics of three sympatric rattlesnakes species in the Sonoran desert. *Journal of Herpetology*, 29: 211-223.
- Bentley, P. J., Schmidt-Nielsen, K. (1966). Cutaneous water loss in reptiles. *Science*, 151(3717), 1547-1549.
- Bovo, R.P., Marques, O.A.V., Andrade, D.V. (2012). When basking is not an option: thermoregulation of a viperid snake endemic to a small island in the south Atlantic of Brazil. *American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Copeia*. pp. 408-418.
- Butler, A. B. (1974). Retinal projections in the night lizard, *Xantusia vigilis* Baird. *Brain Research*, 80(1), 116-121.

- Butler, AB, Northcutt, RG. 1971 Retinal projections in *Iguana iguana* and *Anolis carolinensis*. Brain Research. 26, 1 – 13.
- Campbell, A.L., Naik, R.R., Soward, L., Stone, M.O. (2002). Biological infrared imaging and sensing. Micron, 33: 211-225.
- Campbell, J.A., Lamar, W.W. (2004). The venomous reptiles of the western hemisphere, vol. II. Comstock/ Cornell University Press, Ithaca, New York. 870p.
- Campbell, S. R., Mackessy, S. P., Clarke, J. A. (2008). Microhabitat use by brown treesnakes (*Boiga irregularis*): effects of moonlight and prey. Journal of Herpetology, 42(2), 246-250.
- Castellón–Huerta, B. (2001). Cúmulo de símbolos. La serpiente emplumada. Arqueología Mexicana 53:28-35.
- Chiszar, D., Wickman, D., Colton, J. (1986). Sensitivity to thermal stimulation in prairie rattlesnakes (*Crotalus viridis*) after bilateral anesthetization of the facial pits. Behavioral Neural Biology. 45(1):143-149.
- Clark, R.W., Dorr S.W., Whitford M.D., Freymiller G.A., Putman BJ. (2016). Activity cycles and foraging behaviors of free-ranging sidewinder rattlesnakes (*Crotalus cerastes*): the ontogeny of hunting in a precocial vertebrate. Zoology. Volume 119, 3, Pages 196-206.
- Clarke, J. A., Chopko, J. T., Mackessy, S. P. (1996). The effect of moonlight on activity patterns of adult and juvenile prairie rattlesnakes (*Crotalus viridis viridis*). Journal of Herpetology, 192-197.
- Crews, D., Hingorani, V., Nelson, R.J. (1988). Role of the pineal gland in the control of annual reproductive behavioral and physiological cycles in the red-sided garter snake (*Thamnophis sirtalis parietalis*). Journal of Biological Rhythms 3: 293-302.
- Daan, S. (2010). A history of chronobiological concepts. Pp. 1-36. En Albercht, Urs. (ed.) The circadian clock, Protein reviews Vol. 12. Springer Science.
- Daltry JC, Ross T, Thorpe RS, Wuster W. (1998). Evidence that humidity influences snake activity patterns: a field study of the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. Ecography. 21(1):25-34.
- Davidson, A.J., Poole, A.S., Yamazaki, S., Menaker, M. (2003). Is the food entrainable circadian oscillator in the digestive system? Genes Brain Behavior 2: 32–39.
- Degenhardt, W.G., Painter, C.W., Price, A.H. (1996). Amphibians and Reptiles of New Mexico. University of New Mexico Press, Albuquerque.

- Derobert, Y., Médina, M., Rio, J. P., Ward, R., Repérant, J., Marchand, M. J., Miceli, D. (1999). Retinal projections in two crocodylian species, *Caiman crocodylus* and *Crocodylus niloticus*. *Anatomy and embryology*, 200(2), 175-191.
- Diario Oficial de la Federación 30/diciembre/2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.
- Dubocovich, M. L., Benloucif, S., Masana, M. I. (1995). Melatonin receptors in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *Behavioural brain research*, 73(1-2), 141-147.
- Ebbesson, S. O., Karten, H. J. (1981). Terminal distribution of retinal fibers in the tegu lizard (*Tupinambis nigropunctatus*). *Cell and Tissue Research*, 215(3), 591-606.
- Ellis, D. J., Firth, B. T., Belan, I. (2006). Circadian rhythm of behavioral thermoregulation in the sleepy lizard (*Tiliqua rugosa*). *Herpetologica*, 62(3), 259-265.
- Ellis, D.J., Firth, B.T., Belan, I. (2007). Circadian rhythms of locomotor activity and temperature selection in sleepy lizards, *Tiliqua rugosa*. *Journal of Comparative Physiology A*. 193:695–701.
- Ellis, D. J., Firth, B. T., Belan, I. (2008). Interseasonal variation in the circadian rhythms of locomotor activity and temperature selection in sleepy lizards, *Tiliqua rugosa*. *Journal of Comparative Physiology A*, 194(8), 701.
- Ellis, D. J., Firth, B. T., Belan, I. (2009). Thermocyclic and photocyclic entrainment of circadian locomotor activity rhythms in sleepy lizards, *Tiliqua rugosa*. *Chronobiology international*, 26(7), 1369-1388.
- Evans, K. J. (1966). Responses of the locomotor activity rhythms of lizards to simultaneous light and temperature cycles. *Comparative biochemistry and physiology*, 19(1), 91-103.
- Firth, B. T., Belan, I. (1998). Daily and seasonal rhythms in selected body temperatures in the Australian lizard *Tiliqua rugosa* (Scincidae): field and laboratory observations. *Physiological Zoology*, 71(3), 303-311.

- Firth, B. T., Kennaway, D. J., Rozenblds, M. A. M. (1979). Plasma melatonin in the scincid lizard, *Trachydosaurus rugosus*: diel rhythm, seasonality, and the effect of constant light and constant darkness. *General and Comparative Endocrinology*, 37(4), 493-500.
- Firth, B.T., Kennaway, D.J. (1989). Thermoperiod and photoperiod interact to affect the phase of the plasma melatonin rhythm in the lizard, *Tiliqua rugosa*. *Neuroscience Letters*. 106: 125–130.
- Firth, B. T., Thompson, M. B., Kennaway, D. J., Belan, I. (1989). Thermal sensitivity of reptilian melatonin rhythms: " cold" tuatara vs. " warm" skink. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 256(5), R1160-R1163.
- Firth, B. T., Kennaway, D. J., Belan, I. (1991). Thermoperiodic influences on plasma melatonin rhythms in the lizard *Tiliqua rugosa*: effect of thermophase duration. *Neuroscience letters*, 121(1-2), 139-142.
- Firth, B.T., Belan, I., Kennaway, D.J., Moyer, R.W. (1999). Thermocyclic entrainment of lizard blood plasma melatonin rhythms in constant and cyclic photic environments. *The American Physiological Society*. 1620-1626.
- Firth, B. T., Christian, K. A., Belan, I., Kennaway, D. J. (2010). Melatonin rhythms in the Australian freshwater crocodile (*Crocodylus johnstoni*): a reptile lacking a pineal complex? *Journal of Comparative Physiology B*, 180(1), 67.
- Floessner, T., Hut, R. A. (2017). Basic principles underlying biological oscillations and their entrainment. In *Biological timekeeping: clocks, rhythms and behaviour* (pp. 47-58). Springer, New Delhi.
- Foà, A. (1991). The role of the pineal and the retinae in the expression of circadian locomotor rhythmicity in the ruin lizard, *Podarcis sicula*. *Journal of Comparative Physiology A* 169:201-207.
- Foà, A., Monteforti, G., Minutini, L., Innocenti, A., Quagliari, C., Flamini, M. (1994). Seasonal changes of locomotor activity patterns in ruin lizards *Podarcis sicula*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 34(4), 267-274.

- Foà, A., Bertolucci, C. (2001). Temperature cycles induce a bimodal activity pattern in ruin lizards: masking or clock-controlled event? A seasonal problem. *Journal of Biological Rhythms*, 16(6), 574-584.
- García, U., Güizado, A. (2008). *Crotalus triseriatus*. Body temperature. *Herpetological Bulletin*. 42-43.
- Goldberg, S. R. (1999). Reproduction in the blacktail rattlesnake, *Crotalus molossus* (Serpentes: Viperidae). *Texas J. Sci*, 5(4), 323-328.
- Golombek, D.A., Rosenstein, R.E. (2010) Physiology of circadian entrainment. *Physiology Rev.* 90, 1063-1102.
- Gómez-Álvarez, G.; Reyes-Gómez, S.R., Teutli-Solano, C., Valadez-Azúa, R. (2007). La medicina tradicional prehispánica, vertebrados terrestres y productos medicinales de tres mercados del valle de México. *Etnobiología* 5:86-98.
- Graham, T. E., Hutchison, V. H. (1978). Locomotor activity in *Chrysemys picta*: response to asynchronous cycles of temperature and photoperiod. *Copeia*, 1978(2), 364-367.
- Graves, M., Duvall, D. (1985). Avomnic prairie rattlesnakes (*Crotalus viridis*) fail to attack rodent prey. *Z. Tierpsychol.* 67:161-166.
- Greene, H.W. (1999). Radiotelemetry and the annual cycle of Black-tailed Rattlesnakes (*Crotalus molossus*). Pages 134-135. En H.W. Greene, *Snakes, the Evolution of Mystery in Nature*. University of California Press, Berkeley.
- Greene, H.W., May, P.G., Hardy, D.L., Sciturreo, J.M., Farrell, T.M. (2002). Parental behaviour by vipers. En G.W. Schuett, M. Höggren, and H.W. Greene, *Biology of the Vipers*, Eagle Mountain Publishing. Pp. 179-206.
- Griffiths, R. A. (1984). The Influence of Light and Temperature on Diel Activity Rhythms in the Sand Boa, *Eryx conicus*. *Journal of Herpetology*, Vol. 18, No. 4. pp. 374-380.
- Grimm, A., Ramírez, A. M. P., Moulherat, S., Reynaud, J., Henle, K. (2014). Life-history trait database of European reptile species. *Nature Conservation*, 9, 45.

- Hardy, D.L., Greene, H.W. (1999). Borderland blacktails: radiotelemetry, natural history, and living with venomous snakes. Pp. 117–121 En G. J. Gottfried, L. G. Eskew, C. G. Curtin, and C. B. Edminster (Eds.), *Toward Integrated Research, Land Management, and Ecosystem Protection in the Malpai Borderlands: Conference Summary*; 6–8 January 1999; Douglas, AZ. Proc. RMRS-P-10, U. S. Department of Agriculture, Forest Serv., Rocky Mt. Res. Sta., Fort Collins, Colorado.
- Heckrotte, C. (1975) Temperature and light effects on the circadian rhythm and locomotory activity of the plains garter snake (*Thamnophis radix hayendi*), *Journal of Interdisciplinary Cycle Research*.
- Helm B, Visser ME, Schwartz W, Kronfeld-Schor N, Gerkema M, Piersma T, Bloch G. (2017). Two sides of a coin: ecological and chronobiological perspectives of timing in the wild. *Philosophical Transactions R. Soc. B* 372: 20160246.
- Huey, R.B. (1982). Temperature, physiology, and the ecology of reptiles. En: Gans, C., Pough, F.H. (Eds.), *Biology of the Reptilia XII*. Academic Press, New York, pp. 25–91.
- Hut RA, Kronfeld-Schor N, Van der Vinne V, de la Iglesia HO (2012) In search of a temporal niche: environmental factors. *Prog Brain Res* EBR5:1–27
- Hoffmann, K. (1968). Synchronisation der circadianen Aktivitätsperiodik von Eidechsen durch Temperaturcyclen verschiedener Amplitude. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 58(2), 225-228.
- Innocenti, A., Minutini, L., Foà, A. (1993). The pineal and circadian rhythms of temperature selection and locomotion in lizards. *Physiology & behavior*, 53(5), 911-915.
- Innocenti, A., Bertolucci, C., Minutini, L., Foà, A. (1996). Seasonal variations of pineal involvement in the circadian organization of the ruin lizard *Podarcis sicula*. *Journal of Experimental Biology* 199:1189-1194.
- Janik, D.S., Pickard, G.E., Menaker, M. (1990). Circadian locomotor rhythms in the desert iguana II. Effects of electrolytic lesions to the hypothalamus. *Journal of Comparative Physiology A* 166:811-816.

- Janik, D., Cassone, V. M., Pickard, G. E., Menaker, M. (1994). Retinohypothalamic projections and immunocytochemical analysis of the suprachiasmatic region of the desert iguana *Dipsosaurus dorsalis*. *Cell and tissue research*, 275(3), 399-406.
- Jaramillo-Alba, J. L., de la Vega, A. H. D., Bucio-Jiménez, L. E., Méndez-De la Cruz, F. R., Pérez-Mendoza, H. A. (2020). Comparative thermal ecology parameters of the mexican dusky rattlesnake (*Crotalus triseriatus*). *Journal of Thermal Biology*, 92, 102695.
- Kardong, K.V., Mackessy, S.P. (1991). The strike behavior of a congenitally blind rattlesnake. *Journal of Herpetology*, 25, 208-211.
- Klein DC, Moore RY, Reppert SM. (1991). *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. New York: Oxford Univ. Press.
- Korf, H. W., Wagner, U. (1981). Nervous connections of the parietal eye in adult *Lacerta s. sicula* Rafinesque as demonstrated by anterograde and retrograde transport of horseradish peroxidase. *Cell and Tissue Research*, 219(3), 567-583.
- Krochmal, A.R., Bakken, G.S. (2003). Thermoregulation in the pits: use of thermal radiation for retreat site selection by rattlesnakes. *Journal of Experimental Biology*, 206, 2539- 2545.
- Lamb, T. D., Collin, S. P., Pugh, E. N. (2007). Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(12), 960-976.
- Landreth HF. 1973. Orientation and Behavior of the rattlesnake, *Crotalus atrox*. *American Society of Ichthyologists and Herpetologists*. Vol. 1973, No. 1, pp. 26-31.
- Lee, J. C. (1974). The diel activity cycle of the lizard, *Xantusia henshawi*. *Copeia*, 934-940.
- Lelièvre, H., Blouin-Demers, G., Bonnet, X., Lourdais, O. (2010). Thermal benefits of artificial shelters in snakes: a radiotelemetric study of two sympatric colubrids. *Journal of Thermal Biology*, 35(7), 324-331.
- Lelièvre, H., Rivalan, P., Delmas, V., Ballouard, J. M., Bonnet, X., Blouin-Demers, G., Lourdais, O. (2013). The thermoregulatory strategy of two sympatric colubrid snakes affects their demography. *Population Ecology*, 55(4), 585-593.
- Lemos-Espinal, J. A., Smith, G. R., Ballinger, R. E. (1997). Observations on the body temperatures and natural history of some Mexican reptiles.

- Liner, E.A., Casas-Andreu, G. (2008). Nombres estándar en Español en Inglés y nombres científicos de los anfibios y reptiles de México/Standard Spanish, English and scientific names of the amphibians and reptiles of Mexico. Second edition. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Herpetological Circular 38.
- Lomb, N. R. (1976). Least-squares frequency analysis of unequally spaced data. *Astrophysics and space science*, 39(2), 447-462.
- López-Olmeda, J. F., Madrid, J. A., Sánchez-Vázquez, F. J. (2006). Light and temperature cycles as zeitgebers of zebrafish (*Danio rerio*) circadian activity rhythms. *Chronobiology international*, 23(3), 537-550.
- Maciel, A., Di-Bernardo M., Hartz, S.M., Oliveira R.B., Pontes, G.M.F., (2003). Seasonal and daily activity patterns of *Liophis poecilogyrus* (Serpentes: Colubridae) on the north coast of Rio Grande do Sul, Brazil. *Amphibia-Reptilia*, 24(2), 189-200.
- Madrid-Sotelo, C.A., Balderas-Valdivia, C.J. (2008). Técnicas de colocación de radiotransmisores en serpientes. *Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana*, 16 (1): 5-12.
- Marques, O.A.V., Eterovic A., Endo, W. (2001). Seasonal activity of snakes in the Atlantic Forest in Brazil. *Amphibia-Reptilia* 20: 103–111.
- Marques, O. A., Sawaya, R. J., Stender-Oliveira, F., Franca, F. G. (2006). Ecology of the colubrid snake *Pseudablabes agassizii* in south-eastern South America. *The Herpetological Journal*, 16(1), 37-45.
- Mendonca, M.T., Tousignant, A.J., Crews, D. (1995). Seasonal changes and annual variability in daily plasma melatonin in the red-sided garter snakes (*Thamnophis sirtalis parietalis*). *General and Comparative Endocrinology* 100: 226-237.
- Mendonca, M.T., Tousignant, A.J., Crews, D. (1996a). Courting and non-courting male garter snakes (*Thamnophis sirtalis parietalis*): plasma melatonin and the effects of pinealectomy. *Hormones and Behavior* 30: 176-185.
- Mendonca, M.T., Tousignant, A.J., Crews, D. (1996b). Pinealectomy, melatonin and courtship behavior in male red-sided Garter snakes (*Thamnophis sirtalis paritetalis*). *The Journal of Experimental Zoology*. 274:63 – 74.

- Minutini, L., Innocenti, A., Bertolucci, C., Foà, A. (1995). Circadian organization in the ruin lizard *Podarcis sicula*: The role of the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus. *Journal of Comparative Physiology A* 176:281-288.
- Miranda-Anaya, M., Bartell, P., Yamazaki, S., Menaker, M. (2000). Circadian rhythm of ERG in *Iguana iguana*: Role of the pineal. *Journal of Biological Rhythms* 15:163-171.
- Moyer, R. W., Firth, B. T., Kennaway, D. J. (1997). Effect of variable temperatures, darkness and light on the secretion of melatonin by pineal explants in the gecko, *Christinus marmoratus*. *Brain research*, 747(2), 230-235.
- Mrosovsky, N. (1999). Masking: history, definitions, and measurement. *Chronobiology international*, 16(4), 415-429.
- Northcutt RG, Butler AB. (1974). Evolution of Reptilian Visual Systems: Retinal Projections in a Nocturnal Lizard, *Gekko gekko* (Linnaeus). *The Journal of Comparative Neurology*. Oct 15;157(4):453-65.
- Oishi, T., Nagai, K., Harada, Y., Naruse, M., Ohtani, M., Kawano, E., Tamotsu, S. (2004). Circadian rhythms in amphibians and reptiles: ecological implications. *Biological Rhythm Research*, 35(1-2), 105-120.
- Oliveira, M. E., Martins, M. (2001). When and where to find a pitviper: activity patterns and habitat use of the lancehead, *Bothrops atrox*, in central Amazonia, Brazil. *Herpetological Natural History*, 8(2), 101-110.
- Paci, O., Akani, G. C., Eniang, E. A., Segniagbeto, G. H., Nasone, W. R., Luiselli, L., Vignoli, L. (2018). Who does bask longer? A comparison between elapid and viperid snakes in the field and in experimental conditions. *Zoologischer Anzeiger*, 277, 116-120.
- Paranjpe, D. A., Sharma, V. K. (2005). Evolution of temporal order in living organisms. *Journal of Circadian Rhythms*, 3:7.
- Parpinelli, L., Marques, O. A. (2008). Seasonal and daily activity in the Pale-headed Blindsnake *Liotyphlops beui* (Serpentes: Anomalepidae) in southeastern Brazil. *South American Journal of Herpetology*, 3(3), 207-212.

- Pereira-da-Cruz, JG.; Reinert, M.; Schmitt, AAJ. (2006). Variações circadianas em *Spilotes pullatus* (Colubridae). *Biotemas*, 19 (4): 49- 53.
- Pereira da Cruz JG. (2007). Ritmo circadiano e atividade locomotora em *Bothrops jararacussu* (Serpentes, Viperidae). *Biotemas*, 20 (3): 55-61. ISSN 0103 – 1643.
- Pereira da Cruz JG, Del Magro DD, Niehues da Cruz J. (2008a). Padrões de atividade locomotora diária de *Bothrops jararacussu* (Serpentes: Viperidae): Uma resposta relacionada às condições ambientais de luminosidade ou a ritmos endógenos? *Biotemas*, 21 (4): 123-129, dezembro de 2008. ISSN 0103 – 1643
- Pereira da Cruz, GJ. Grimes, C, Ronchi L, Pecini da Cunha Vanessa. (2008b). The influence of circadian rhythms on the metabolism of the snake *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae). *Acta Sci. Biol. Sci.*, 327-331.
- Pittendrigh, C. S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. En *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 25, pp. 159-184). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Pittendrigh, C. S., Minis D. H. (1964). The entrainment of circadian oscillators by light and their role as photoperiodic clocks. *The American Naturalist*. (98): 261-294.
- Pittendrigh, C. S., Daan, S. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of comparative physiology*, 106(3), 291-331.
- Pohl H.H. (1998). Temperature cycles as zeitgeber for the circadian clock of two burrowing rodents, the normothermic antelope ground squirrel and the heterothermic Syrian hamster. *Biol. Rhythm Res*. 29:311–325.
- Proske, U. (1969). Vibration-sensitive mechanoreceptors in snake skin. *Experimental Neurology* 23(1):187-194.
- Quay, W.B., (1979). The parietal eye - pineal complex, pp. 245-406. En: Gans C. *et al.*, (Edits). *Biology of the Reptilia Vol 9, Neurology A*. London: *Academic Press*.
- Redlin, U. (2001). Neural basis and biological function of masking by light in mammals: suppression of melatonin and locomotor activity. *Chronobiology international*, 18(5), 737-758.

- Rensing, L., Ruoff, P. (2002). Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. *Chronobiology international*, 19(5), 807-864.
- Rismiller, P. D., Heldmaier, G. (1988). How photoperiod influences body temperature selection in *Lacerta viridis*. *Oecologia*, 75(1), 125-131.
- RUOA (2020). Red Universitaria de Observatorios Atmosféricos de la Universidad Nacional Autónoma de México. <https://www.ruoa.unam.mx/index.php?page=estaciones&id=1>.
- Schroeder, D.M. (1981). Retinal afferents and efferents of an infrared sensitive snake, *Crotalus viridis*. *J. Morphol.* 170, 29–
- Schuett, G.W. (1992). Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers? Pp. 169–184 En: Campbell JA, Brodie ED Jr, (Eds.), *Biology of the Pitvipers*. Selva, Tyler, Texas.
- Secor SM. (1994). Ecological significance of movements and activity range for the sidewinder, *Crotalus cerastes*. *Copeia*. 3:631-45.
- Secor, S.M., Nagy, K.A. (1994). Bioenergetic correlates of foraging mode for the snakes *Crotalus cerastes* and *Masticophis flagellum*. *Ecology* 5:1600–1614.
- Semarnat, 2018. Programa de Acción para la Conservación de las Especies: Serpientes de Cascabel (*Crotalus* spp.). Semarnat/Conanp, México.
- Sharma, V. K. (2003). Adaptive significance of circadian clocks. *Chronobiology international*, 20(6), 901-919.
- Sheeba, V., Sharma, V. K., Chandrashekar, M. K., Joshi, A. (1999). Persistence of eclosion rhythm in *Drosophila melanogaster* after 600 generations in an aperiodic environment. *Naturwissenschaften*, 86(9), 448-449.
- Shine R. (1979). Activity pattern in Australian elapid snake (Squamata: Serpentes: Elapidae). *Herpetologica*. 35(1):1-11.
- Shine, R., Madsen, T. (1996). Is thermoregulation unimportant for most reptiles? An example using water pythons (*Liasis fuscus*) in tropical Australia. *Physiological Zoology*, 69(2), 252-269.
- Sokolove, P. G., Bushell, W. N. (1978). The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *Journal of theoretical biology*, 72(1), 131-160.

- Stuginski DR, Sant'Anna SS, Fernandes W, Abe AS. (2012). Circadian pattern of *Bothrops moojeni* in captivity (Serpentes: Viperidae). *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. Vol. 18, 1. Pp 97-102.
- Tackenberg, M. C., Hughey, J. J. (2020). The risks of using the chi-square periodogram to estimate the period of biological rhythms. *BioRxiv*.
- Tapia-Osorio, A., Salgado-Delgado, R., Angeles-Castellanos, M., Escobar, C. (2013). Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat. *Behavioural brain research*, 252, 1-9.
- Tawa, Y., Jono, T., Numata, H. (2014). Circadian and temperature control of activity in Schlegel's Japanese gecko, *Gekko japonicus* (Reptilia: Squamata: Gekkonidae). *Current herpetology*, 33(2), 121-128.
- Tennant, A. (1984). *The Snakes of Texas*. Texas Monthly Press, Austin, Texas. 561 pp.
- Tilden, A.R., Hutchinson, V.H. (1993). Influence of photoperiod and temperature on serum melatonin in the diamondback water snake, *Nerodia rhombifera*. *General and Comparative Endocrinology* 92: 347-354.
- Thomas, K.R., Thomas, R. (1978). Locomotor Activity Responses to Photoperiod in Four West Indian Fossorial Squamates of the Genera *Amphisbaena* and *Typhlops* (Reptilia, Lacertilia). *Journal of herpetology*. Vol. 12, No. 1. pp. 35-41.
- Tosini, G. (1997). The pineal complex of reptiles: physiological and behavioral roles. *Ethology Ecology & Evolution* 9: 313-333.
- Tosini, G, Menaker M. (1995). Circadian rhythm of body temperature in an ectotherm (*Iguana iguana*). *Journal of Biological Rhythms* 10: 248-255.
- Tosini, G, Menaker, M. (1998). Multioscillatory circadian organization in a vertebrate, *Iguana iguana*. *Journal of Neuroscience* 18:1105-1114.
- Tosini, G., Bertolucci, C., Foà, A. (2001). The circadian system of reptiles: a multioscillatory and multiphotoreceptive system. *Physiology & behavior*, 72(4), 461-471.
- Tozetti, A.M., Martins, M. (2012). Daily and seasonal activity patterns of free range South-American rattlesnake (*Crotalus durissus*). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (2013) 85(3): 1047-1052.

- Tozetti, A.M., Vettorazzo, V., Martins, M. (2009). Shortterm movements of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in southeastern Brazil. *Herpetol J* 19: 201-206.
- Uribe-Peña, Z., Ramírez-Bautista, A., Casas-Andreu, G. (1999). *Anfibios y Reptiles de las Serranías del Distrito Federal, México*. Cuadernos 32, Instituto de Biología, UNAM, México D.F. 119 pp.
- Underwood, H. (1981). Circadian organization in the lizard *Sceloporus occidentalis*: The effects of pinealectomy, blinding, and melatonin. *Journal of comparative physiology*, 141(4), 537-547.
- Underwood, H. (1983). Circadian organization in the lizard *Anolis carolinensis*: A multioscillatory system. *Journal of Comparative Physiology [A]* 152:265-274.
- Underwood, H. (1985). Pineal melatonin rhythms in the lizard *Anolis carolinensis*: effects of light and temperature cycles. *Journal of Comparative Physiology A*, 157(1), 57-65.
- Underwood, H. (1990). The pineal and melatonin regulators of circadian function in lower vertebrates. *Experientia*. Jan 15, 46(1): 120-128.
- Underwood, H. (1992). Endogenous rhythms. *Biology of the Reptilia*, 18, 229-297. En C. Gans and D. Crews (Eds.), *Biology of the Reptilia*, Volume 18. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, U.S.A.
- Underwood, H. (2000). Circadian organization in non mammalian vertebrates. En: Takahashi, Turek, Moree (Eds.) *Handbook of behavioural neurobiology*, vol 12. Circadian clocks. Kluwer Academic, Plenum Press, New York, pp. 111 - 140.
- Underwood, H., Menaker, M. (1970). Extraretinal light perception: entrainment of the biological clock controlling lizard locomotor activity. *Science*, 170(3954), 190-193.
- Villarreal-Medina A.B. (2018). Ritmo circadiano de la actividad locomotriz de la víbora *Crotalus molossus* y su respuesta a diferentes tipos de fotoperiodos. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vitaterna, M.H., Takahashi, J.S., Turek, F.W. (2001). Overview of circadian rhythms. *Alcohol research & health: the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 25(2), 85-93.

- Vitt, L. J., Blackburn, D. G. (1991). Ecology and life history of the viviparous lizard *Mabuya bistrriata* (Scincidae) in the Brazilian Amazon. *Copeia*, 916-927.
- Vitt, L. K., Zani P.A., Lima A.C.M. (1997). Heliotherms in tropical rainforest: the ecology of *Kentropyz calcarata* (Teiidae) and *Mabuya nigropunctata* (Scincidae) in the Curua-Una of Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 13:199-220.
- Vivien-Roels, B., Arendt, J. (1983). How does the indoleamine production of pineal gland respond to variation of the environment in a non-mammalian vertebrate, *Testudo hermanni*, Gmelin. *Psychoneuroendocrinology* 8: 327-332.
- Watanabe, N., Itoh, K., Mogi, M., Fujinami, Y., Shimizu, D., Hashimoto, H., ..., Suzuki, T. (2012). Circadian pacemaker in the suprachiasmatic nuclei of teleost fish revealed by rhythmic period2 expression. *General and comparative endocrinology*, 178(2), 400-407.
- Werler J. E., Dixon J. R. (2000). Texas snakes. Identification, distribution and natural history. University of Texas Press, Austin.
- Whitaker, P.B., Shine, R. (2003). A radiotelemetric study of movements and shelter-site selection by free-ranging brown snakes (*Pseudonaja textilis*, Elapidae). *Herpetol Monogr.* 17:130-44.
- Whiting, M. J., Dixon, J. R., Greene, B. D. (1996). Measuring snake activity patterns: the influence of habitat heterogeneity on catchability. *Amphibia-Reptilia*, 17(1), 47-54.
- Wideman, C. H., Murphy, H. M. (2009). Constant light induces alterations in melatonin levels, food intake, feed efficiency, visceral adiposity, and circadian rhythms in rats. *Nutritional neuroscience*, 12(5), 233-240.