



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la ritmicidad circadiana del sistema
de glutatión en cerebro y ojos en los fenotipos
albino y pigmentado de *Ambystoma mexicanum*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Carolina Patiño González



DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. Sebastián Ricardo Zúñiga Lagunes

Cd. Mx. 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Patiño
González
Carolina
5520725553
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308297034

2. Datos del tutor

M. en C.
Zúñiga
Lagunes
Sebastián Ricardo

3. Datos Sinodal 1

Dra.
Escamilla
Chimal
Elsa Guadalupe

4. Datos Sinodal 2

Dra.
Robles
Mendoza
Cecilia

5. Datos Sinodal 3

Dr.
Arellano
Aguilar
Rodolfo Omar

6. Datos Sinodal 4

M. en C.
Prieto
Sagredo
Julio Alejandro

7. Datos del trabajo escrito.

Evaluación de la ritmicidad circadiana del sistema de glutatión en cerebro y ojos en los fenotipos pigmentado y albino de *Ambystoma mexicanum*

74pp
2023

DEDICATORIA

A los juveniles de ajolote *A. mexicanum* utilizados en este estudio. Esperando que este trabajo aporte información relevante en beneficio al conocimiento y la recuperación de esta especie en su ambiente natural



AGRADECIMIENTOS

La verdad no sé por donde empezar. El camino para la culminación de este trabajo fue largo y francamente pensé en abandonar muchísimas veces, me costó lágrimas, frustración y muchos problemas personales pero bueno, al fin llegó el día y henos aquí.

Quiero agradecer a la Facultad de Ciencias y al laboratorio de Ecotoxicología de organismos acuáticos pues este sitio se volvió mi segundo hogar, hubo días que estuve aquí desde el amanecer hasta el anochecer. A mí tutor el M. en C. Sebastián Zúñiga por su paciencia, tiempo y dedicación para conmigo y este proyecto; a la Dra Cecy Vanegas por invitarme a colaborar en este y otros proyectos que sin duda alguna son "el desarrollo de personaje de este capítulo llamado titulación de licenciatura". Al, espero pronto, Dr. Julio Prieto Sagredo por toda su ayuda con la enseñanza de ritmos biológicos, el programa COSANA y su buena vibra para enseñar. De manera muy especial quiero agradecer al Dr. José Antonio Ocampo Cervantes, Jefe CIBAC por la donación de los organismos para este trabajo. Y no menos importante a mi super mejor "colego" José Manuel Valdés Caro por su gran amistad y cariño te quiero mucho amigo.

A la mesa de Rol vampiro la Mascarada: Óscar, Arturo y Mishi gracias por las risas y su amistad que me recuerda que aún estamos jóvenes.

A mis amados padres Rosa María González Alemán y Sergio Patiño Leal sin ellos hoy no estaría aquí, en verdad muchas gracias por todo. A mi perrita Juno por todo su amor incondicional y soporte emocional. A mi muy amado novio y mejor amigo Carlitos Reyes Jaramillo no alcanzan las hojas para contar todo lo que me has dado a lo largo de estos años.

Y por último y no menos importante a la Prometeo de la era del internet Alexandra Elbakyan, en verdad derribaste la barrera de la ciencia.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Ritmicidad circadiana	3
1.2 Balance REDOX y su relación con los ritmos circadianos en estructuras centrales.	7
1.2.1. En ojos.....	7
1.2.2. En Cerebro	9
1.2.3. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y sistema antioxidante.....	11
1.3. Sistema glutatión.....	13
1.4. Melanina.....	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	17
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS.....	19
5.1. General	19
5.2. Objetivos particulares.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6.1. Obtención y mantenimiento de organismos experimentales	20
6.2. Desarrollo experimental.....	21
6.3. Declaración de bioética	22
6.4. Determinación del sistema glutatión en cerebro y ojos.....	24
6.5. Análisis Estadístico	26
7.RESULTADOS	27
7.1. Parámetros Físicoquímicos	27
7.2. Ritmicidad circadiana del sistema glutatión en los dos fenotipos de <i>A.</i> <i>Mexicanum</i>	27
7.2.1.Ritmicidad de balance redox en cerebro de ajolotes.....	27
7.2.2. Ritmicidad de balance redox en el ojo de los ajolotes	33
7.2.3. Razón GSH/GSSG en Cerebro y Ojos.....	38
8. DISCUSIÓN.....	42
8.1. Ritmicidad circadiana del balance redox en cerebro.....	42
8.2. Ritmicidad circadiana del balance redox en ojos	45

9. CONCLUSIONES	51
10. LITERATURA CITADA	53

RESUMEN

El sistema circadiano sincroniza las diferentes funciones fisiológicas y bioquímicas de los organismos en un ciclo cercano a las 24 h del día (circadianas), lo cual les permite maximizar su respuesta en relación a los cambios ambientales que les rodea. El metabolismo de las células y los tejidos fluctúa de manera circadiana, esto se ve reflejado en los patrones diarios del consumo de oxígeno y, dado que este es empleado por la cadena de transporte de electrones como fuente energética, también es la principal vía de generación de ROS (especies reactivas de oxígeno), los cuales son regulados a nivel celular por diferentes sistemas antioxidantes, siendo el principal el glutatión. Debido a problemas ambientales en el hábitat natural de *Ambystoma mexicanum*, la población ha presentado endogamia provocando, entre otros problemas, generaciones de ajolotes albinos. En mamíferos albinos, se ha determinado una mayor susceptibilidad a la luz por esta condición, resultando en alteraciones a niveles fisiológicos, bioquímicos y en la expresión rítmica de los mismos, en comparación con organismos con melanina; dada la escasa información en anfibios de estos aspectos por estos aspectos anteriormente mencionados, el objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de la expresión circadiana del sistema glutatión a nivel del cerebro y ojos (órganos de control circadiano), en ajolotes pigmentados y albinos, así como comprobar si existen diferencias en la expresión del ritmo y la concentración del GSH y GSSG en los dos fenotipos. Se obtuvo una puesta de huevos del ajolote *A. mexicanum* a través del Centro de Investigación Biológica y Acuícola de Cuernavaca (CIBAC) de la UAM-Xochimilco. Los organismos, una vez eclosionados, se mantuvieron en solución Hoffreter hasta alcanzar la talla y pesos adecuados para la realización de los análisis bioquímicos; se separaron por fenotipo: pigmentación normal o pigmentado (N) y albina (A), conforme se fueron presentando durante su desarrollo larval. Los juveniles de ajolote, se alimentaron diariamente *ad libitum* con nauplios de *Artemia salina*, pequeños peces de *Chirostoma* spp. y *Tubifex* sp. a lo largo del mantenimiento y periodo experimental. Ya alcanzada la talla, los organismos se separaron en 2 grupos: fenotipo pigmentado y fenotipo albino en acuarios de 20 L con las mismas condiciones de mantenimiento descritas previamente y la alimentación se restringió a un horario de 12 pm a 2 pm. Los dos grupos de organismos se mantuvieron durante 5 días con un fotoperiodo 12:12 luz-oscuridad (LO) en un cuarto aislado de fuentes de luz externas. Al término de este periodo, se obtuvieron el cerebro y los ojos de un subgrupo de cada fenotipo con un intervalo de 4 h a lo largo de un ciclo de 24 h. Un segundo subgrupo continuó por 4 días más con un fotoperiodo de oscuridad constante (OO), al término, se obtuvieron los mismos tejidos en el mismo intervalo de tiempo de LO. La determinación del glutatión en los tejidos se realizó de acuerdo con lo propuesto por Griffith (1980) y Baker *et al.* (1990). La ritmicidad circadiana del sistema antioxidante de Glutatión se determinó por medio del Análisis

de COSINOR con ayuda del programa de COSANA. Los resultados demostraron que el sistema de glutatión presenta ritmicidad circadiana en el cerebro de ambos fenotipos, teniendo poca diferencia en cuanto a su amplitud y contenido neto del GSH y GSSG, en pigmentados fue de 1287.34 μ moles de GSH/g PH y de 22.73 μ moles de GSSG/g PH; en los albinos fue de 1258.03 μ moles de GSH/g PH y de 21.95 μ moles de GSSG/g PH. En los ojos de ambos fenotipos se encontraron ritmos circadianos en el GSH de pigmentados y en el GSSG de los albinos en LO, mientras que el GSH de albinos y en el GSSG de pigmentados en OO presentaron ritmo circadiano y en el GSH de albinos y el GSSG de pigmentados en LO; el GSH de pigmentados y el GSSG de albinos en OO, el componente circadiano fue bimodal para ambos fotoperiodos: Se observó que los ajolotes albinos presentaron mayor susceptibilidad por la exposición normal de la luz, la cual se vio reflejado en la expresión del ritmo, así como en una mayor amplitud del ciclo del glutatión a comparación con lo observado para los organismos pigmentados. Dados los problemas ambientales existentes en Xochimilco, como es una mayor turbidez y zonas de penumbra por la presencia del lirio acuático, una modificación en el ritmo pudiera repercutir en la sobrevivencia de los ajolotes, tanto en los pigmentados como los albinos (más en estos últimos) haciéndolos presas más fáciles de las carpas y las tilapias.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ritmicidad circadiana

El ambiente físico en nuestro planeta presenta cambios periódicos diarios y anuales derivados del movimiento de rotación y de traslación, dichos cambios se observan en la luz, la temperatura, la humedad o los cambios mareales. La vida desde su origen, ha tenido que hacer frente a estos eventos, por tanto, la anticipación del cambio a dichos ciclos ambientales derivan en una programación temporal de los organismos como estrategia para su supervivencia (Pittendrigh, 1981).

Para su estudio, los ritmos se pueden trazar a partir de una serie de descriptores registrados regularmente llamados series de tiempo para lo cual se utilizan los parámetros del ritmo. La fase es un punto de referencia a lo largo de una oscilación; el periodo es el tiempo que una fase tarda en completar un ciclo; la frecuencia es el número de ciclos por unidad de tiempo; la acrofase es el pico matemático más alto de una oscilación; el mesor es la media del ritmo; la amplitud es la distancia entre el mesor y la amplitud; la batifase es el punto más bajo de una oscilación. (Dunlap *et al.*, 2004; Koukkari y Sothorn, 2006).

El movimiento de rotación terrestre determina los patrones de fotoperiodos diarios, el sistema fisiológico responsable de “medir el tiempo” y sincronizar los procesos internos con los eventos diarios en el ambiente es conocido como sistema circadiano. Los ritmos circadianos son aquellos llevados a cabo por un reloj interno que permite a los organismos coordinar sus actividades fisiológicas con los ciclos ambientales como la luz, con los ciclos de los depredadores y los cambios estacionales (Ruggiero y Silver, 2010). Existen además otros ritmos asociados a ciclos geofísicos como los mareales, las fases lunares y las estaciones del año, los cuales de acuerdo a su frecuencia los podemos de igual manera clasificar en ritmos circamareales, circalunares y circanuales (Aschoff *et al.*, 1967).

Los ritmos circadianos regulan muchos de los ritmos biológicos relacionados con las funciones bioquímicas, fisiológicas y el comportamiento de los organismos que se repiten en intervalos regulares y les proveen marcos de organización temporal (Dunlap *et al.*, 2004). Esta ritmicidad circadiana ha sido estudiada ampliamente en numerosos organismos y se expresan en numerosos procesos incluyendo la actividad, sueño-vigilia, la alimentación, la temperatura corporal y la producción hormonal (Dunlap *et al.*, 2004) así como el metabolismo aerobio y el balance redox celular (Xu *et al.*, 2012). Estos ritmos están adaptados a las condiciones físicas y sociales de los individuos y a las condiciones funcionales de la maquinaria molecular que cada uno posee (Gruart *et al.*, 2002). El sistema circadiano está compuesto por señales aferentes, las cuales sincronizan al organismo, esta señal se puede encontrar en un oscilador primario que puede efectuar un ciclo manifiesto o puede estar acoplada a osciladores periféricos (i.e hígado o pulmones). Los estímulos exógenos, cambios externos en el ambiente (i.e. la luz, la temperatura) pueden actuar como un componente pasivo, es decir, que puede modificar la expresión de un ritmo pero no tienen influencia en el reloj endógeno (Moore, 1984).

Los organismos más estudiados a la fecha son los mamíferos y de ellos se conocen las principales estructuras del sistema circadiano. De estas estructuras, el núcleo supraquiasmático (NSQ) localizado en el hipotálamo, es el órgano regulador circadiano principal, el cuál recibe los estímulos luminosos a través del tracto retinohipotalámico. En anfibios, al igual que en vertebrados no mamíferos, se ha descrito que la organización circadiana principal presenta características multioscillatorias, es decir, hay más de un reloj circadiano involucrado en la producción de un ritmo y se han identificado tres sitios que exhiben ritmicidad autónoma: la glándula pineal, el área supraquiasmática del hipotálamo y los ojos (específicamente la retina); de manera adicional, se ha descrito más de una vía de entrada fótica: los fotorreceptores extrarretinales ubicados en el cerebro y en la glándula pineal y los fotorreceptores cutáneos (Oishi *et al.*, 2004; Underwood, 2001).

Cabe destacar que los estudios de las estructuras que funcionan como marcapasos principales se han realizado principalmente en anfibios anuros, donde *Xenopus leavis* ha sido el organismo modelo para estudiar tanto la fisiología como las funciones circadianas de la retina (Besharse e Iuvone, 1983; Green y Besharse, 2004). En otras especies, estudios llevados a cabo con oftalmectomía en renacuajos de *Rana catesbeiana* y *Rana pipiens*, muestran la contribución de los ojos en el control circadiano de los anfibios (Wright *et al.*, 2006). Asimismo, Bertolucci y Foà (2004) mencionan que dentro del complejo pineal de los anuros existe una estructura autónoma denominada órgano frontal, que en *Rana clamitans* es capaz de sincronizarse a la luz y en *Rana esculenta* tiene función secretora involucrada en la reproducción anual. En urodelos, en *Cynops pyrrhogaster* se menciona que para la regulación de los niveles de melatonina en sangre se requiere de la glándula pineal y de los ojos (Chiba *et al.*, 2005).

Los estudios de ritmicidad en anfibios realizados, a nivel conductual, dan a conocer que la actividad de ese grupo varía dependiendo de su etapa de desarrollo y del estado reproductivo en el que se encuentren, como ocurre en *Triturus vulgaris* y *T. cristatus* (Dolmen, 1976); en *Cynops pyrrhogaster* (Oishi *et al.*, 2004) además influyen la humedad y la temperatura; en *Xenopus leavis* presenta también ritmicidad en el movimiento de pigmentos en el tegumento, esto debido a la liberación periódica de melanopsina (Bertolesi *et al.*, 2020; Oishi *et al.*, 2004). Chiba y sus colaboradores en 1993, mencionan que en *Cynops pyrrhogaster* los ojos probablemente aporten menos en la organización circadiana que la pineal, ya que en los organismos con pinealectomía se suprimió por completo el ritmo de actividad locomotora a diferencia de aquellos con enucleación ocular bilateral en quienes hubo poco cambio en libre corrimiento. En *Ambystoma mexicanum* se ha determinado la ritmicidad circadiana de la actividad locomotora, corroborando el estímulo de luz como sincronizador central. Asimismo el alimento se postula como un sincronizador importante, capaz de marcar fase y modular la actividad hacia un comportamiento diurno unimodal (Valdez-Caro, 2019).

La actividad de los organismos está fuertemente relacionada con la actividad metabólica, pues de ello depende la producción y disponibilidad de energía. El estado redox de las células implica la reducción y oxidación de diversas moléculas esto se evidencia para metabolitos que representan los equivalentes de reducción como el NADH, NADPH, FADH₂ y para otros intermediarios en la cadena de transporte de electrones (Milev y Redy, 2015; Gillette y Wang, 2014).

La ritmicidad circadiana y el estado redox están íntimamente relacionados. La tasa metabólica fluctúa de manera circadiana en casi todos los organismos estudiados, y se relaciona con la expresión de la actividad de diversas enzimas involucradas en los mecanismos bioquímicos energéticos y balance redox, así como en la respiración mitocondrial (Hardeland *et al.*, 2003). Hay una gran variedad de estudios realizados con ratas y ratones, por ejemplo, en hígado de rata, O'Neil y Fenney (2014) mencionan numerosos procesos metabólicos que están regulados de manera circadiana, tales como glucólisis, ciclo de Krebs, metabolismo de purinas y grasas, razón NADP⁺/NADPH, expresión de genes reloj, expresión de mRNA y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés reactive oxygen species); así mismo, Stokkan y colaboradores (2001) postulan que el hígado pudiera ser la principal ubicación anatómica del oscilador sincronizable por alimento (por sus siglas en inglés FEO). Diversos autores señalan también que los niveles de glutatión tienen fluctuaciones a lo largo del día en hígado, intestino, pulmones y páncreas (Issacs y Binckley, 1997; Li *et al.*, 1997, Neuschwander-Tetri y Rozin, 1996) .

El balance redox de estos últimos tejidos, presentan ritmicidad circadiana, sin embargo, son considerados osciladores periféricos; por otro lado, el cerebro y los ojos tienen estructuras que forman parte del reloj central (núcleo supraquiasmático, pineal y retina), por lo cual influyen en la regulación del ritmo de otros órganos.

1.2 Balance REDOX y su relación con los ritmos circadianos en estructuras centrales.

1.2.1. En ojos

Los ojos forman parte del sistema visual, median las respuestas de la luz, proveen de información mediante la formación de imágenes y brindan información temporal al Sistema Nervioso Central (Sivak y Sivak 2000; Hill *et al.* 2012). El ojo de los organismos vertebrados, está compuesto por la córnea, el iris, la pupila, el lente y la retina. Las primeras cuatro estructuras brindan protección, regulan la cantidad de luz que penetra al ojo a través de la pupila y enfocan la imagen sobre la retina (Fig. 1) (Kandori *et al.* 2001).

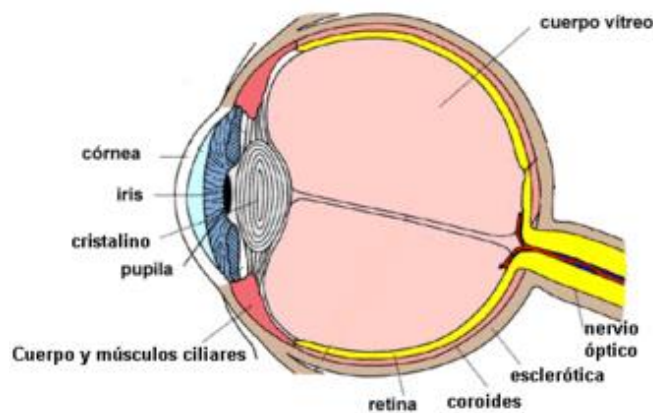


Fig. 1. Estructura del ojo vertebrado (tomado y modificado de <https://www.conicet.gov.ar/especialistas-del-conicet-descubren-nuevas-funciones-de-una-proteina-en-la-retina-de-vertebrados-diurnos/>)

La retina, por otro lado, es una extensión del cerebro con localización periférica, en ella se encuentran los fotorreceptores (conos y bastones) que llevan a cabo la recepción de la luz. Junto con estas células especializadas, la información lumínica es llevada a diferentes tipos de neuronas que extraen información pertinente de intensidad, contenido cromático, contraste, movimiento y posición; toda esta información converge en los diferentes centros del cerebro con ayuda del nervio óptico. Adicionalmente los fotorreceptores pueden codificar de la luz información temporal concerniente a la alternancia de la noche, el día y los cambios estacionales; toda esta información es transmitida al reloj central en el cerebro lo

cual sincroniza los ritmos biológicos con los ciclos ambientales (Kandori *et al.*, 2001; Strettoi y Parisi, 2014).

Relacionado a lo antes mencionado, en la retina del ojo se presentan fluctuaciones diarias en los niveles de dopamina (en el día) y de melatonina (en la noche), compuestos relacionados con la vigilia-sueño, este comportamiento rítmico persiste incluso en condiciones constantes de oscuridad, como ha sido observado en *Xenopus laevis* (Anderson y Green, 2000); además los ritmos circadianos que se describen están controlados por un reloj central (Green y Besharse, 2004; Anderson y Green, 2000); todo esto permite a la retina no solo percibir los cambios de iluminación, sino también anticiparse a ellos (Underwood, 2001; Anderson y Green, 2000).

De manera particular, la exposición constante de los ojos a la luz los hace susceptibles a la generación de ROS por un efecto fototóxico controlado. Las membranas neuronales, la retina y otras estructuras del ojo presentan en su constitución ácidos grasos poliinsaturados. Diversos estudios realizados sobre el efecto de la luz intensa sobre la retina de mamíferos, ha determinado que hay lipoperoxidación en la membrana de la retina por la detección de isoprostanos, que es uno de los isómeros derivados de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana (Dentchev *et al.*, 2007).

Por el otro lado, el alto requerimiento energético de los fotorreceptores para su funcionamiento en las diferentes capas de la retina, es otra característica que vuelve a los ojos susceptibles a los ROS, dada su abundancia en mitocondrias en el segmento interno y área nuclear de los bastones y conos, la capa más reactiva de la retina, además de que es un tejido de alto consumo de oxígeno y de glucosa (Wong-Riley, 2010; Dentchev *et al.*, 2007; Dmitriev, y Mangel, 2004; Handelman y Dratz, 1986; Fliesler y Anderson, 1983).

Diversos estudios han observado que el ojo de vertebrados presenta mecanismos de protección antioxidante en sus diferentes estructuras (la córnea, lente, RPE y retina), similares a los que se pueden encontrar en otros tejidos; estos incluyen además antioxidantes enzimáticos como glutatión peroxidasa, catalasas y superóxido dismutasa, así como antioxidantes no enzimáticos como el glutatión, vitamina A y E, además de pigmentos retinales como la melanina y carotenoides, los cuales se ha observado que son de gran importancia para evitar una mayor fototoxicidad en los ojos de los organismos (Mittag *et al.*, 1999; Beatty *et al.*, 2000). La actividad circadiana redox de esta actividad fotodinámica está determinada en primera instancia por los ciclos de luz-oscuridad (Hakkari *et al.*, 2016, Anderson y Green, 2000).

1.2.2. En Cerebro

El cerebro de los vertebrados consta de una maquinaria eficiente para coordinar la producción, entrega, almacenamiento y utilización de la energía. Es ampliamente aceptado que los cambios en el flujo sanguíneo cerebral y utilización de glucosa inducidos por la actividad del metabolismo energético cerebral son el resultado y no la causa de la actividad neuronal (Belanger *et al.*, 2011)

El cerebro es un órgano con alta demanda energética, consume una gran cantidad de O₂ haciendo que éste sea muy susceptible al estrés oxidante (Bothwell y Gillette, 2018). La principal fuente de energía en el cerebro proviene de la glucosa, energía obtenida a través del ciclo de Krebs y de la glicolisis-se obtiene de 30 a 36 ATP por glucosa, dependiendo de la eficiencia de la fosforilación oxidativa (Lehninger *et al.*, 2007). Los estudios de Squire y colaboradores (2013) mencionan que una considerable formación de ROS proviene del metabolismo oxidativo de la glucosa asociado con la fosforilación oxidativa y la cadena de electrones mitocondrial donde la coordinación activa del NADPH y de manera central el glutatión, permiten reducir los efectos oxidativos de los ROS producidos normalmente.

Se ha reportado que el cerebro de los mamíferos puede tener un consumo de glucosa de 0.266 mmol/ g tejido/ min (Squire *et al.*, 2013); en relación a su tamaño, este órgano presenta una elevada tasa metabólica asociado a un elevada demanda de oxígeno, siendo en humanos alrededor del 20% del oxígeno corporal total (Bothwell y Gillette , 2018; Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2010). Además, el cerebro presenta una gran cantidad de ácidos grasos insaturados, lo cual lo hacen blanco de la lipoperoxidación causada por los ROS (Dringen *et al.*, 2000; Limón- Pacheco y Gosebatt, 2010).

La actividad cerebral, determinado por su tasa metabólica y metabolismo de la glucosa, como lo es en otros órganos y tejidos, presenta ritmicidad circadiana (Hut *et al.*, 2012; Aschoff, 1984). El principal oscilador circadiano, ampliamente descrito en mamíferos (Bothwell y Gillette, 2018; Sollars y Pickard, 2015), se encuentra en el núcleo supraquiasmático (localizado en la zona ventral periventricular del hipotálamo en el área dorsal del quiasma óptico) y el tracto retinohipotalámico (Sollars y Pickard, 2015; Peek *et al.*, 2015); en estos sitios se genera directamente el ritmo del comportamiento, del sueño-vigilia, de la alimentación, del metabolismo, etc., entre otros procesos fisiológicos importantes, debido a los procesos endocrinos involucrados (Bothwell y Gillette, 2018; Sollars y Pickard, 2015; Peek *et al.*, 2015; Gillette y Wang, 2014). Las oscilaciones metabólicas juegan un papel importante en la formación de los ritmos circadianos, en estos procesos se ven involucradas las funciones de expresión de los genes y proteínas reloj, organizados en procesos de retroalimentación controlando de esta forma la temporalidad de la vida. (Peek *et al.*, 2015; Milev y Reddy, 2015).

La ritmicidad del balance redox en el núcleo supraquiasmático es esencial para el correcto funcionamiento del sistema circadiano, pues la modulación de la excitabilidad de la membrana neuronal regula el paso de los iones a través de la membrana (Wang *et al.*, 2012; Hille, 2001) como ocurre con los canales de K⁺ de las neuronas; ello puede activar o inactivar varias señales celulares que ocasionan

cambios en la expresión de genes circadianos, los cuales originan cambios de fase (Ko *et. al.*, 2009).

Por otro lado, es conocido que la homeostasis redox en el cerebro y en el sistema nervioso central se puede observar en diversos aspectos de la función, procesamiento y regulación vinculados a la señalización y metabolismo, donde las reacciones de oxidación y reducción específicas regulan diversos procesos neurológicos (Franco y Varagas, 2018). En las membranas neuronales del cerebro, los ácidos grasos no solamente experimentan una peroxidación lipídica por radicales libres, sino también la oxidación de proteínas y la oxidación y formación de aductos del DNA, afectando de este modo los procesos de señalización entre las neuronas del sistema nervioso central y del sistema nervioso periférico (Simonian *et al.*, 1996).

Como ya se mencionó en párrafos anteriores, el sistema circadiano sincroniza los diferentes ritmos a los cambios ambientales para prevenir la ocurrencia simultánea de reacciones antagónicas mutuas, que de otro modo resultarían en un gasto energético innecesario, aprovechándose las funciones metabólicas y conductuales (Milev y Reddy, 2015).

En los animales, las variaciones circadianas diarias de múltiples respuestas incluyendo la actividad locomotora, el metabolismo aerobio y la actividad cerebral, así como las variaciones en la temperatura y en el fotoperiodo (intensidad y periodo), pueden resultar en patrones diarios de ROS (Hardeland *et al.*, 2003) los cuales podrían contribuir al daño oxidante en ausencia de un balance adecuado en el sistema antioxidante para contrarrestarlo (Birden *et al.*, 2012).

1.2.3. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y sistema antioxidante.

Los ROS (por sus siglas en inglés; Reactive Oxygen Species) son originados de manera natural como resultado del metabolismo celular aerobio; la mayor fuente intracelular de ROS es la mitocondria, pues del oxígeno que dicho organelo

consume, del 1- al 2% deriva en la formación de ROS (Boveris y Chance, 1973; Circu y Aw, 2010); esto ocurre en dos puntos en la cadena de transporte de electrones: en el complejo I (NADH deshidrogenasa) y en el complejo III (ubiquinona- citocromo *c* reductasa) (Turrens, 1997; Murphy, 2009). Los ROS derivadas del oxígeno se clasifican en dos grupos, radicales y no radicales. Los radicales como el anión superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH \cdot), peroxilos (RO_2) y alcoxilos ($RO\cdot$) contienen al menos un electrón desapareado alrededor de su núcleo atómico; en el grupo de los no radicales se encuentra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) el cual a pesar de no tener electrones desapareados es una molécula muy reactiva (Kohen y Niyasca, 2002).

Los ROS en bajas o moderadas concentraciones, producto del metabolismo aerobio celular, tienen como función, regular las vías de señalización como es la proliferación celular (células sanas y cancerígenas), la senescencia y la migración celular (Circu y Aw, 2010) y su producción es regulada por el sistema antioxidante celular (Dempsey 1991; Dempsey y Amabile-Cuevas, 1991; Storz e Imlay, 1999; Lushchak, 2001). Sin embargo, en elevadas concentraciones los ROS pueden causar efectos adversos en las células y tejidos como la oxidación de proteínas, la peroxidación lipídica, el daño oxidativo en el DNA y alteraciones en la homeostasis del Ca^{+2} (Cajaraville *et al.*, 2003). Esto es, ante un desbalance entre oxidantes y antioxidantes y por lo tanto ante la alteración o pérdida del balance redox, se generan daños que pueden comprometer la integridad celular y fisiología de algún órgano, proceso conocido como estrés oxidante (Lushchak, 2016).

Los organismos han desarrollado mecanismos antioxidantes que ayudan a mantener un estado REDOX celular óptimo, retardando o previniendo la oxidación de diversas moléculas. El sistema antioxidante involucra moléculas de dos tipos: enzimáticas y no enzimáticas. En las enzimáticas, se incluye a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), Glutatión peroxidasa (GTPx), Glutatión transferasa, Peroxiredoxina y Tioredoxina (TRX); las no enzimáticas son Vitaminas (A, C y E), los β -Carotenos, metalotioneínas y el glutatión (Birden *et al.*, 2012).

Los sistemas antioxidantes han sido ampliamente estudiados en anfibios ya que por su historia de vida (metamorfosis, reproducción o hibernación) dicho sistema se modifica y también son buenos bioindicadores de contaminación, se han estudiado los efectos de diversos contaminantes como pesticidas, xenobióticos, metales, compuestos nitrogenados, medicamentos e incluso efectos de la luz en diferentes órganos, como hígado, (Ortiz- Santaliestra *et al.*, 2010; Cuypers *et al.*, 2010; Shinn *et al.*, 2008; Christin *et al.*, 2004; Anguiano *et al.*, 2001; Fordham *et al.*, 2001; Coocke 1970 y 1972; Kaplan y Overpeck 1964), riñón, cerebro (Vadillo, 2015; Arroyo *et al.* 2012; Vogiatzis y Loumbourdis 1998), ojos (Yusiov 2000) y organismo entero (Zhang *et al.*, 2019).

1.3. Sistema glutatión

Del grupo de antioxidantes no enzimáticos, el sistema glutatión (glutatión reducido GSH y oxidado GSSG) es el principal mecanismo de balance redox celular y el antioxidante más soluble (Birben *et al.*, 2012; Circu y Aw, 2010). En las células, el GSH se mantiene en mayor proporción (90 - 95%) del glutatión total a través de la síntesis *de novo* y la reducción enzimática continua del GSSG formado, dado que el sistema previene la oxidación de proteínas y grupos tiol y la reducción de hidroperóxidos (Birben *et al.*, 2012). El GSH además provee de equivalentes reductores para la glutatión peroxidasa (GPx) con el cual cataliza la reducción de hidroperóxidos de lípidos en sus correspondientes alcoholes y la reducción del peróxido de hidrógeno en agua; posteriormente la enzima glutatión reductasa (GR) recicla el GSSG reduciéndolo nuevamente a GSH (Fig. 2) (Kosower y Kosower, 1978).

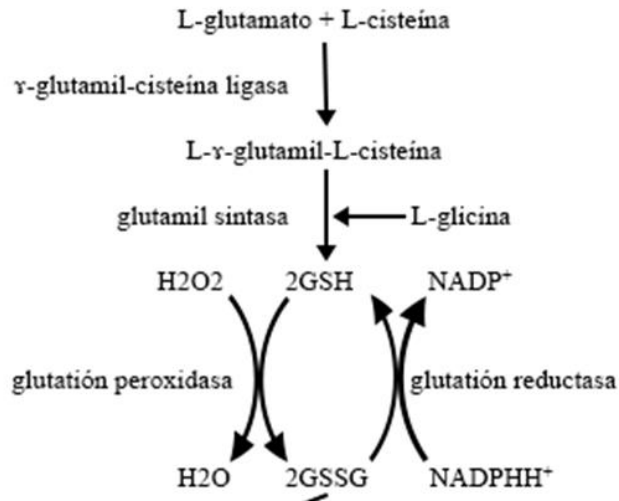


Figura 2. Síntesis de glutatión y su ciclo de reciclamiento (Tomado y modificado de Mason *et al.*, 2010). GSH: glutatión reducido; GSSG; glutatión oxidado, NADP+ /NADPHH+ : nicotinamín adenín dinucleótido fosfato oxidado/reducido

Aunque los ROS son generados normalmente por procesos endógenos, del metabolismo celular aerobio, en los organismos, existen fuentes exógenas que inducen la formación de estos radicales de oxígeno como son los metales pesados (i.e. el hierro, cobre, cadmio, mercurio, níquel, plomo y arsénico) que reducen o inhiben la actividad de algunas enzimas; la generación de los radicales libres, altamente reactivos, se realiza por medio de la reacción de Fenton y Haber-Weiss con los metales; también por la exposición a pesticidas, la radiación ionizante y la luz UV (Birden *et al.*, 2012; Kohen y Nysca, 2002). En los humanos, De la Paz (1992) indica que la luz UV puede causar lipoperoxidación y producción de hidroperóxidos en tejidos expuestos. En anfibios, Yusiov y colaboradores (2000) sugieren que la luz visible puede aumentar el estrés oxidativo y causar una regulación positiva compensatoria de las actividades de las enzimas antioxidantes en los ojos de la *Rana temporaria*, esto se corroboró en la *Rana dybowskii*, donde demostraron que la exposición a largo plazo incrementó la actividad enzimática de SOD y CAT (Nan *et al.*, 2022).

1.4. Melanina

Las melaninas son pigmentos que tienen propiedad redox, con la capacidad de donar o aceptar electrones (oxidación y reducción de las unidades de quinona) durante el proceso de absorción de la luz; en presencia del oxígeno (O₂), el pigmento reacciona por foto-oxidación dando como resultado la formación de radicales libres, una semiquinona⁻ y el anión superóxido (O⁻), que en presencia de los mecanismos de protección redox (i.e. SOD, Catalasa y Glutación) el O⁻ se puede reducir rápidamente a H₂O₂ y posteriormente con los mismos mecanismos a H₂O + O₂; con esta misma transferencia de electrones, la semiquinona⁻ se reduce nuevamente a quinona restaurándose nuevamente la melanina (Sealy, 1980; Sarna 1992; Riley 1997; Boulton *et al.*, 2001).

La melanina es el principal pigmento presente en pelo, piel y ojos de los vertebrados y es uno de los mecanismos que tienen los organismos para protegerse de la luz y la radiación UV (Riley, 1997; Sealy *et al.*, 1980). La melanina es el producto final de una serie de transformaciones de oxidación enzimática de la tirosina, formando biopolímeros heterogéneos que contienen unidades de quinona y de hidroxiquinona, que es esencialmente un polímero de indol-quinona. La melanina se clasifican en base a su color en: eumelanina y neuromelanina (pigmentos marrones a negros), feomelanina (pigmentos amarillos a rojos) y alomelanina (pigmentos marrones a negros en plantas y hongos) así como productos de la combinación de eumelaninas y feomelaninas (Sealy *et al.*, 1980; Prota, 1992 y 1995; Sarna 1992; Ito, 2003). La melanina se encuentra contenida en unos gránulos llamados melanosomas, gránulos compuestos por una densa masa de eumelanina y proteínas, rodeadas por una membrana (Sarna 1992).

En los ojos, los melanosomas se encuentran en el iris (en el *stratum corneum*) y en el epitelio pigmentado de la retina (RPE; Sarna, 1992). A pesar de que ambas estructuras oculares poseen melanina, Weiter y colaboradores (1986) reportaron que en ojos humanos sanos, la cantidad de melanina del epitelio retinal pigmentado (RPE por sus siglas en inglés) es independiente de la coloración del ojo y de la

cantidad de melanina que posea el iris. En la retina, hay otros pigmentos que tienen la capacidad de absorber la luz visible que no incide sobre los fotorreceptores para evitar distorsiones por el reflejo y ayudan con el proceso de la visión como son: la lipofucsina, que al igual que la melanina, absorbe en una banda ancha de la luz visible; las porfirinas, que se encuentran en la hemoglobina y otras proteínas, que absorben alrededor de los 400 nm en mayor grado y en menor grado alrededor de los 600 nm; las flavinas y flavoproteínas que absorben la luz azul (450 nm) y, el pigmento macular que absorbe la luz entre los 400 y 530 nm (Boulton *et al.*, 2001)

Se asume que la melanina ocular tiene la misma función fotoprotectora que en la piel (Hu, 2007; Sarna y Swartz, 1993; Sarna, 1992), absorbiendo todo el espectro electromagnético de la luz visible y la UV (Sealy *et al.*, 1980) en los segmentos externos de los fotorreceptores de la retina, evitando la dispersión de la luz y convirtiendo en calor los fotones absorbidos (Sarna, 1992; Boulton *et al.*, 2001). Se ha reportado que los animales pigmentados son menos fotosensibles que los que presentan pigmentación parcial o que son albinos de la misma especie (Noell, 1980; Sarna, 1992; Hielscher *et al.*, 2009).

Los principales daños que puede experimentar el ojo por la luz incluyen: daño mecánico o ionización, dado por una alta radiación luminosa u ondas de choque de corta duración; fotocoagulación térmica o fotovaporización, dado por un incremento súbito de la temperatura o radiación en la región azul/verde o roja ocasionado por láseres; daño fotoquímico que es el más común que se presenta en condiciones ambientales, con potencial daño a la retina (Boulton *et al.*, 2001; Glickman *et al.*, 2000; Sarna 1992).

En organismos con baja o nula cantidad de melanina, los efectos potenciales del albinismo se han realizado, principalmente en mamíferos a través del estudio de la ausencia de la melanina en piel y en los ojos. Prusky y sus colaboradores (2002), encontraron que las ratas albinas presentaron baja agudeza visual en comparación con las ratas pigmentadas, además se ha encontrado que presentan un umbral

visual elevado (Balkema *et al.*,2001; Balkema, 1988; Balkema y Drager, 1991;); otras investigaciones encontraron en grupos albinos además, daños en la discriminación visual (Rhoades y Henry, 1977), baja sensibilidad al contraste en todas las frecuencias espaciales (Birch y Jacobs, 1979) y respuestas pupilares bajas y lentas a la luz (Green *et al.*,1994). A nivel anatómico, en las ratas albinas, se encontraron diferencias en las proyecciones retinianas a los núcleos subcorticales visuales que están involucrados en las funciones visomotoras, circadianas y de sueño-vigilia (Fleming *et al.*,2006). A su vez, Possidente *et al.*, (1982) encontraron que el ritmo circadiano de la actividad locomotora se ve acortado en ratas albinas. En cuanto a estudios en anfibios, Grant *et al.* (2003) determinó que los albinos de *Xenopus laevis* no presentan desvíos o deformaciones en sus proyecciones retinohipotalámicas, como ocurre a diferencia de los mamíferos.

En todos los casos anteriormente descritos, la falta de melanina en estructuras oculares (retina y tracto retinohipotalámico), que en mamíferos forman parte del sistema que controla los ritmos circadianos y en anfibios forma parte del reloj circadiano, modificaron funciones visuales, de expresión conductual y circadiana, por lo que podríamos esperar alteraciones potenciales para el sistema circadiano de glutatión.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Ambystoma mexicanum es un anfibio urodelo endémico de la Cuenca del Valle de México y cuya distribución actual se restringe a la zona lacustre de Xochimilco (Contreras *et al.*, 2009). Es una especie neoténica que tiene la capacidad de regenerar los tejidos de sus extremidades, cola, cerebro y corazón (Muneoka *et al.*,1986; Chernoff and Stocum, 1995; Nye *et al.*, 2003 a y b). Debido a los problemas ambientales de su hábitat natural como el aporte de contaminantes (i.e. compuestos nitrogenados, plaguicidas, metales, entre otros), la fragmentación de su hábitat, así como la introducción de especies competidoras y depredadoras (como *Cyprinus carpio* y *Oreochromis niloticus*),

la población de *Ambystoma mexicanum* ha sido adversamente afectada, con reducciones severas de su población; por lo cual ha sido categorizada como especie en peligro de extinción (Contreras *et al.*, 2009; Zambrano *et al.*, 2007). La reducción severa del tamaño poblacional y la fragmentación de su hábitat puede ser una causa probable de la reducción en la heterogeneidad de la especie y de endogamia poblacional entre los ejemplares de la población silvestre reducida, incidiendo en generaciones de ajolotes albinos, con repercusiones genéticas y ambientales adversas para la especie.

A sabiendas de que la información en anfibios albinos, sobre todo en *A mexicanum* es poca en general, y más en relación con el sistema circadiano y de los efectos que puede ocasionar una mutación pigmentaria (como el albinismo) en ellos, abre todo un campo de investigación novedosa debido a que si se conoce de antemano que en mamíferos albinos la susceptibilidad a la luz es mucho mayor que en organismos pigmentados (con melanina), entonces una condición albina podría tener en ellos, alteraciones a diferentes niveles fisiológicos y bioquímicos, que finalmente podrían alterar funciones moduladoras como lo son los ritmos circadianos a nivel de los receptores de la luz (ojos) y posiblemente la alteración final en sistema de control central (cerebro).

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿El sistema antioxidante de glutatión presentará ritmicidad circadiana en el cerebro y ojos del ajolote *Ambystoma mexicanum*?. Si se presenta lo anterior, ¿Qué efectos tendría la condición albina de *Ambystoma mexicanum* sobre dicha expresión tanto en ojos como en cerebro?

4. HIPÓTESIS

1. Si la actividad cerebral presenta oscilaciones rítmicas, tales como en el consumo de glucosa y actividad neuronal y a su vez esta pueda gener

patrones de ROS, entonces el sistema glutatión (GT, GSH, GSSG) como un mecanismo antioxidante, deberá también expresar una actividad circadiana en el cerebro de los ajolotes de ambos fenotipos.

2.- Si los ojos como fotorreceptores están acoplados a los ciclos lumínicos y además la luz genera un efecto fototóxico sobre las membranas de la retina haciéndola susceptible a la producción de ROS, entonces el sistema glutatión como mecanismo antioxidante podrá presentar un ritmo circadiano asociado al ciclo de luz-oscuridad en los organismos pigmentados y albinos, sin distinción alguna.

3.- Si la melanina es un mecanismo de protección para evitar el estrés oxidante derivado de la exposición a la luz (radiación UV principalmente), entonces una condición de albinismo determinará una mayor susceptibilidad de estrés oxidante en comparación a los organismos que presentan melanina en la piel y en los ojos; se espera entonces que el balance GSH/GSSG en ajolotes albinos sea diferente en relación con los ajolotes pigmentados a nivel de ojos y cerebro debido a que al no estar presente este pigmento el glutatión oxidado será mayor por los radicales libres resultado de una posible fototoxicidad.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar en juveniles de *Ambystoma mexicanum* la expresión circadiana del sistema glutatión en cerebro y ojos.

5.2. Objetivos particulares

1. Determinar la expresión circadiana del sistema glutatión (oxidado GSH y reducido GSSG) en cerebro y en ojos, en dos fenotipos de *Ambystoma mexicanum*, albino y pigmentado.

2. Determinar si se presentan diferencias en la expresión rítmica y en la concentración del GSH y GSSG entre ajolotes de fenotipo albino y el fenotipo pigmentado.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Obtención y mantenimiento de organismos experimentales

En el manejo, mantenimiento y procedimientos experimentales realizados se siguió las recomendaciones de la Guía Mexicana para el cuidado y uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Los organismos se obtuvieron de una puesta de huevos del ajolote *A. mexicanum* a través de la donación del Dr. José Antonio Ocampo Cervantes, Jefe del Centro de Investigación Biológica y Acuícola de Cuernavaca (CIBAC) de la UAM-Xochimilco. La puesta, de aproximadamente 400 huevos, se mantuvo en acuarios de 20 L con aireación suave y concentración de oxígeno disuelto a saturación (≥ 5.6 mg O₂/L), pH de 7.0 ± 0.5 , temperatura de 20 ± 1 °C y fotoperiodo de 12:12 hrs luz : oscuridad, en solución Holtfreter (SH) al 100%, medio ideal para el mantenimiento y desarrollo de *A. mexicanum* (Robles-Mendoza *et al.*, 2009; Asashima *et al.*, 1989). Diariamente se revisó, en una submuestra de 10 huevos, el desarrollo embrionario bajo microscopio estereoscópico para conocer la etapa de su desarrollo de acuerdo a Schreckenber y Jacobson (1975).

La alimentación, el mantenimiento y la separación de las larvas eclosionadas se mantuvieron de acuerdo a lo señalado por Robles-Mendoza y colaboradores (2011) hasta la etapa de juvenil, caracterizados por el completo desarrollo de las extremidades anteriores y posteriores (Nye *et al.*, 2003 b); los organismos se separaron por fenotipo, pigmentación normal y albina, conforme se fueron presentando durante su desarrollo.

Durante el mantenimiento, los juveniles se alimentaron diariamente *ad libitum* con nauplios de *Artemia salina*, pequeños peces de *Chirostoma* spp. y *Tubifex* (Robles 2009) hasta que alcanzaron 65 días de edad; previo al experimento la alimentación se restringió a un horario de 12pm - 2pm. Los niveles de oxígeno disuelto, pH y temperatura se mantuvieron similares a los descritos previamente y se realizaron recambios del 40% de la SH de los acuarios cada dos días para mantener los niveles de amonio total menores a 0.3 mg N-AT/L.

6.2. Desarrollo experimental

Una vez alcanzada la longitud y el peso requeridos para el estudio de los ajolotes (49.89 ± 0.83 mm LT y 13.95 ± 2.4 g PH), relacionado con los pesos mínimos de los tejidos necesarios para el estudio, los organismos se separaron en grupos de 10 ejemplares por fenotipo: fenotipo N (pigmentado ó normal, silvestre) y fenotipo A (albino blanco) en acuarios de 20 L con solución Holtfreter (SH) y bajo las mismas condiciones de mantenimiento descritas (Fig. 3).

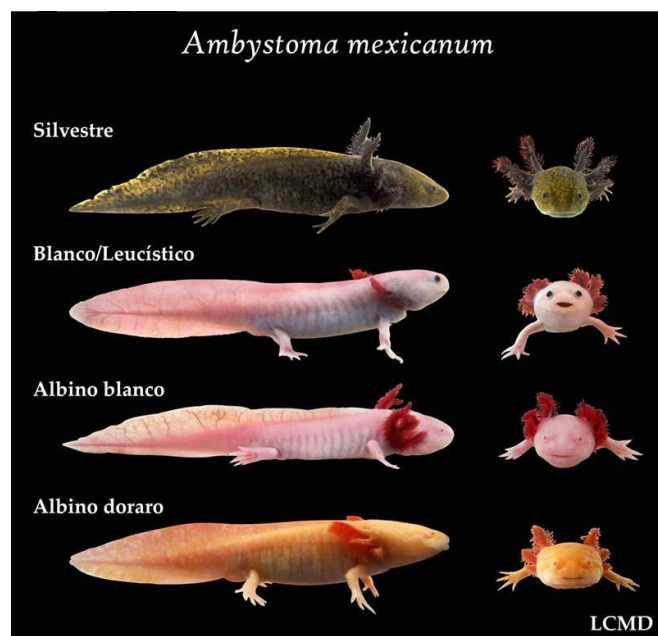


Figura 3. Fenotipos del ajolote *A. mexicanum* (<https://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/develando-los-enigmas-moleculares-del-axolotl-un-organismo-orgullosamente-mexicano/>)

Los organismos se mantuvieron durante 5 días con un fotoperiodo 12:12 (Luz:Oscuridad; LO) con el encendido de la luz a las 7:30. y apagado a las 19:30 horas. Al término de este periodo, se seleccionaron al azar 5 organismos de cada fenotipo, cada 4 h a lo largo de un ciclo de 24 h (12:30; 16:30, 20:30, 0:30, 4:30, 8:30 y 12:30 h). Por ser organismos ectotermos, el método más adecuado de sacrificio para que se cumplieran nuestros objetivos de estudio fue la decapitación y la rápida disección del cerebro y los ojos; para ello, se disminuyó la temperatura del agua de un acuario pequeño de 17 a 10 °C, se colocó al organismo por un par de minutos y posteriormente se paso a otro acuario con agua a cerca de 4 °C por un minuto más, se sacaron y sobre una plancha de plástico sobre hielo y se procedió al sacrificio por decapitación

Al término de éste periodo se realizó la disección del cerebro y ojos en los mismos horarios que en el fotoperíodo de LO.

Durante la exposición de los ajolotes en los diferentes fotoperíodos, se alimentaron diariamente y al mismo intervalo de 12pm a 2pm con charal micro (*Chirostoma sp.*), *Tubifex sp.* y adultos de *Artemia salina*.

Previo a la disección de los organismos, se registró el peso húmedo (g PH), la longitud patrón (LP, mm) y la longitud total (LT, mm) de los ejemplares. Los tejidos disectados se enjuagaron con solución fisiológica fría para anfibios (Vanegas- Pérez *et al.*, 2015) y se mantuvieron en frío para ser pesados (g PH) y almacenados a -80° C en criotubos de 2 ml para su análisis posterior.

6.3. Declaración de bioética

Resulta imprescindible conocer las bases bioéticas del manejo y experimentación con animales para cumplir con los diferentes objetivos de una investigación, siempre considerando que los animales tienen derechos por encima del conocimiento que se pueda adquirir con ellos al utilizarlos, por lo que el seguir un código de ética en el área de las ciencias experimentales nos

permitirá avanzar en el conocimiento y a la vez preservar a los organismos evitando se llegue a abusar de ellos. Para cumplir con lo anterior, se sometio el procedimiento experimental de los organismos a su aprobación por parte de la Comisión de Ética Académica y Responsabilidad Científica (CEARC) de la Facultad de Ciencias (Folio: T_14_09_2023_Patino), quien es la encargada de la revisión de todos los proyectos de investigación con organismos.

Durante el desarrollo de los diseños experimentales, es indispensable seleccionar el punto final de los organismos, principalmente si son expuestos a sustancias tóxicas para evitar estrés y dolor y aún cuando nuestro diseño experimental no incluyó la exposición a compuestos tóxicos, si es necesario considerar el mejor de los métodos para el punto final de los organismos (Navarro, et. al, 2012).

La extrapolación de analgésicos empleados en mamíferos hacia otros grupos animales, no es adecuado, debido a la variedad de respuesta que pueden tener los otros organismos como puede ser una prolongación mayor a lo establecido del efecto anestésico o que incluso no le afecte a la dosis y tenga que incrementarse, respuestas que pudieran ser inducidas por el mismo metabolismo del organismo (CCAC). Aún cuando la alta permeabilidad de la piel de los anfibios permitiría una dosificación segura del anestésico, estos pueden generar un riesgo de complicaciones, por ejemplo se puede reducir o interrumpir la capacidad pulmonar a respirar (CCAC) o el tiempo de recuperación incrementarse con la dosis, como el metasulfonato de tricaína (Hinostroza y Serrano-Martínez, 2013; CCAC).

Hay anestésicos parentales que pueden aplicarse intracelomicamente para una mejor absorción (Michell 2009). Los anestésicos que se pudieran emplear para inducir la eutanasia en organismos acuáticos como es el caso de nuestro estudio en urodelos, la benzocaína, la tricaína metano sulfonato, el etomidato, el metomidato y la quinaldina actúan deprimiendo el sistema nervioso central

(SNC) hasta producir la muerte (The Pennsylvania State University [PennState] s.f); sin embargo, para urodelos como el ajolote *A. mexicanum* al cual se le realiza un estudio precisamente del SNC, los métodos químicos de sacrificio no se pueden realizar por posibles alteraciones que no sabemos puedan influir en los resultados; por otra parte, la opción de inyección abdominal o celómica, no sería recomendable para los ajolotes por el estrés que sufriría el organismo por la manipulación y la inyección, influyendo nuevamente en la respuesta del SNC para defenderse. Aún cuando en la NOM-033-SAG-ZOO-2014 se menciona que el método de eutanasia y sacrificio de los anfibios es por medio de agentes anestésicos y otros químicos, como los mencionados anteriormente, el método más adecuado para que se cumplieran nuestros objetivos de estudio es la decapitación y rápida disección del cerebro, para lo cual se disminuyó la temperatura del agua de un acuario pequeño de 17 a 10 °C por aproximadamente 10 minutos y posteriormente se pasaron a otro acuario con agua a cerca de 4 °C por un minuto, se sacaron y sobre una plancha de plástico sobre hielo se procedió al sacrificio por decapitación para evitar sufrimiento por dolor por el corte realizado y detener cualquier actividad cerebral posterior al sacrificio, como se recomienda en la norma referida anteriormente (NOM-033-SAG-ZOO-2014) debido a lo observado en reptiles.

6.4. Determinación del sistema glutatión en cerebro y ojos.

Los tejidos disectados, cerebro y ojos, se homogenizaron de manera separada en una solución fría (4°C) de ASS (ácido sulfosalicílico) al 5% en una proporción de 1:5 (g Tejido: mL ASS) para el cerebro y de 1:2.5 para los ojos, en microtubos de centrífuga de 2 ml con ayuda de un homogenizador Polytron (PT 1200; KINEMATICA ®). Los homogenados se incubaron en hielo por 15 min y después se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min a 5 °C. El sobrenadante fue separado y mantenido en hielo hasta su posterior análisis. Los sobrenadantes se diluyeron con agua desionizada en una proporción 1:40 (muestra:agua desionizada) para reducir la concentración del ASS a menos del 0.1% para evitar interferencias

con la glutatión reductasa (GR) de acuerdo al método de análisis seguido (Vanegas- Pérez *et al.*, 2015).

Los niveles de Glutatión Total (GT), Glutatión reducido (GSH) y Glutatión oxidado (GSSG) se evaluaron de acuerdo a lo propuesto por Griffith (1980) y Baker *et al.*, (1990), adaptado por Vanegas-Pérez *et al.*, (2015) a microplaca. El principio de dicho método se basa en que el GSH reacciona con la solución de Ellman (DTNB) reduciéndolo a TNB el cual es proporcional al contenido de GSH, donde el producto puede ser cuantificado espectrofotométricamente a 412nm. El GT (que es la suma de GSH + GSSG) se determina por la velocidad de reducción del DTNB por el GSH total, donde el GSSG se reduce en la reacción a GSH por la Glutatión Reductasa (GR); de esta forma el GSH presente en la muestra más el GSH obtenido por la reducción del GSSG, reaccionan con el DTNB para obtener la concentración de GT. Para determinar la concentración de GSSG, a la muestra de sobrenadante diluido 1:40, se le adiciona 2-Vinilpiridina (2-VP) para derivatizar al GSH libre presente y evitar su reacción con el DTNB; después de una incubación de 60 min (la 2-VP reacciona lentamente con el GSH) se le adiciona a la muestra la GR, la cuál reduce el GSSG a GSH el cual puede reducir el DTNB presente por ser una reacción rápida, obteniendo así la concentración de GSSG de las muestras. La cuantificación de la concentración de GSH en la muestra se realiza por la diferencia de GT menos GSSG.

$$(GSH = GT - GSSG)$$

Los resultados obtenidos se expresaron en μ moles/g PH (No se pudieron expresar en μ moles/mg PST, debido a la destrucción de la proteína por el ASS y la muy pequeña cantidad de tejidos obtenidos).

6.5. Análisis Estadístico

La ritmicidad circadiana del sistema antioxidante de Glutación (GSH y GSSG) se determinó por medio del Análisis de COSINOR con ayuda del programa de COSANA, empleando las concentraciones obtenidas de GSH y GSSG en el ciclo de 24 h de cada uno de los fotoperiodos LO y OO de los ajolotes albinos y pigmentados. El Análisis de COSINOR se basa en un análisis parcial de series de Fourier (COSANA ver. 3.1, 1996) que determina el mejor ajuste de oscilación para los datos observados y permite la obtención de un porcentaje de ritmicidad (R%) y su significatividad ($p < 0.05$), parámetros utilizados para la selección del mejor periodo de ajuste a los datos obtenidos. De manera complementaria se utilizó el programa Chronosfit (ver. 1.06) para corroborar la presencia de patrones de ritmicidad obtenidos por el algoritmo de COSANA.

Las diferencias significativas entre los parámetros de mesor y amplitud del ritmo de GSH y GSSG, entre las condiciones de iluminación LO y OO en un mismo fenotipo así como entre los fenotipos pigmentado y albino en una misma condición de iluminación, se establecieron con el análisis de Límites de Confianza para medias poblacionales (Zar, 1999).

De manera adicional para cada fenotipo, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis de análisis de rangos para determinar diferencias significativas en las concentraciones de GSH y GSSG a lo largo del ciclo de 24 h en cada condición de iluminación (LO y OO) (STATISTICA ver. 8.0 Statsoft Inc, 2007).

7.RESULTADOS

7.1. Parámetros Físicoquímicos

Los parámetros físicoquímicos de temperatura, pH, oxígeno disuelto y amonio total en los acuarios de los organismos experimentales se mantuvieron constantes durante todo el desarrollo experimental (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros físicoquímicos registrados en los acuarios experimentales. Se muestra el valor promedio \pm error estándar (n=5).

Temperatura (C°)	pH	Oxígeno disuelto (mg O ₂ /L)	Amonio Total (mg N-AT/L)
16.65 \pm 0.14	6.67 \pm 0.13	6.09 \pm 0.19	1.0 \pm 0.37

7.2. Ritmicidad circadiana del sistema glutatión en los dos fenotipos de *A. Mexicanum*

7.2.1. Ritmicidad de balance redox en cerebro de ajolotes

Las concentraciones del glutatión reducido (GSH) en el cerebro de *A. mexicanum* en el fenotipo normal pigmentado (silvestre) y en el albino, revelan cambios temporales a lo largo del periodo de 24 h en las condiciones de LO y OO (Tabla 2; Figura 4).

En la condición de LO, la concentración en cerebro del GSH en los organismos pigmentados (silvestres), presentó un comportamiento bimodal con un ritmo significativo (periodo) de 11.54 h ($p < 0.05$), con las mayores concentraciones (acrofase) a las 5.53 h cercanas al encendido y apagado de la luz (7.00 am y 7.00 pm) y, niveles promedio de GSH (mesor) de 1293.43 $\mu\text{mol/g PH}$ (Tabla 2; Fig. 4A). Al colocar a los organismos en libre curso, en oscuridad continua (OO) por cuatro días más, el comportamiento de los niveles de GSH en el cerebro se modificó y pasó de presentar un ritmo bimodal en LO a unimodal en OO con un ritmo significativo de 24 h ($p < 0.05$), observándose las menores concentraciones del GSH en la noche subjetiva que se incrementan hasta alcanzar los niveles máximos a las

11.48 h (acrofase), con concentraciones promedio de GSH de 1029.05 $\mu\text{mol/g}$ PH (mesor).

Tabla 2. Parámetros de la ritmicidad del glutati3n reducido (GSH) y glutati3n oxidado (GSSG) en el cerebro del ajolote *A. mexicanum* en LO y OO obtenidos por el modelo COSINOR. Se incluyen valores promedio y de error est3ndar de cada par3metro ($\bar{X} \pm \text{EE}$).

Fotoperiodo	Fenotipo	PIGMENTADO	ALBINO	PIGMENTADO	ALBINO
	Par3metros	GSH	GSH	GSSG	GSSG
LO	PERIODO (h)	11.54 (p = 0.03)	16.3 (p = 0.04)	23.17 (p = 0.05)	24 (p = 0.01)
	MESOR ($\mu\text{mol/g}$ PH)	1293.43 \pm 33.52*	1350.47 \pm 48.76	21.81 \pm 1.43	20.98 \pm 1.58
	AMPLITUD ($\mu\text{mol/g}$ PH)	105.55 \pm 46.22	156.7 \pm 68.17	5.43 \pm 2.07 ^a *	7.63 \pm 2.15 ^b
	ACROFASE (h)	5.53 \pm 0.41 ^a	3.30 \pm 0.58 ^b	20.34 \pm 1.19*	14.2 \pm 1.1
OO	PERIODO (h)	24 (p = 0.01)	24 (p = 0.01)	24 (p = 0.00)	24 (p = 0.025)
	MESOR ($\mu\text{mol/g}$ PH)	1029.05 \pm 36.45*	1074.79 \pm 44.08	20.42 \pm 1.3	23.07 \pm 1.95
	AMPLITUD ($\mu\text{mol/g}$ PH)	164.81 \pm 48.72	231.87 \pm 61.45	6.98 \pm 1.87*	8.6 \pm 2.78
	ACROFASE (h)	11.48 \pm 1.45	9.62 \pm 1.02	8.25 \pm 1.0*	8.03 \pm 1.12

El * indica diferencias significativas (p<0.05) para un mismo par3metro entre los fotoperiodos LO y OO de un mismo fenotipo.

Las letras super3ndices diferentes indican diferencias significativas para un mismo par3metro (p<0.05), entre los fenotipos para una misma condici3n de iluminaci3n.

El an3lisis de L3mites de Confianza para medias poblacionales de los par3metros de ritmicidad determinados por el modelo COSINOR, revel3 diferencias significativas (p<0.05) s3lo en las concentraciones promedio del GSH en el cerebro de los organismos pigmentados (mesor), con niveles del 20% mayor en LO respecto a OO (Tabla 2). Cabe destacar que el an3lisis de Kruskal-Wallis no corrobor3 las diferencias significativas (p<0.05) en las concentraciones de GSH a lo largo del periodo de 24 h en cada condici3n de iluminaci3n LO y OO, lo cual puede obedecer a la dispersi3n de los resultados obtenidos (Tabla 4).

En relación al **fenotipo albino**, el **GSH** presentó un comportamiento bimodal con un ritmo (periodo) de 16.30 h ($p < 0.05$) en la condición de LO, similar a su contraparte pigmentada aunque con un desfase de 4 h, presentando los mayores niveles durante el día y la noche a las 3.30 h (acrofase) y niveles promedio de GSH de $1350.47 \mu\text{mol/g PH}$ (mesor) (Tabla 2; Fig. 4C; Tabla 4).

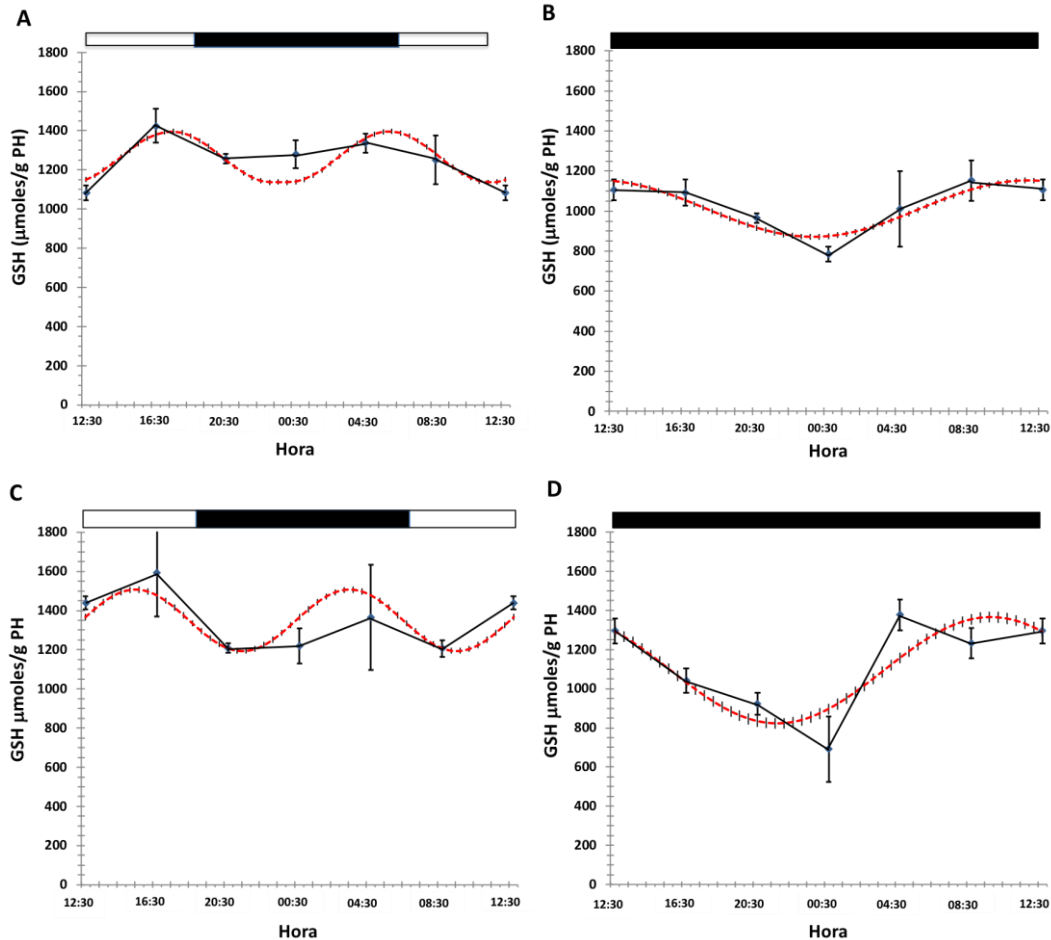


Figura 4. Ritmicidad del Glutati3n reducido (GSH) en el cerebro del ajolote *A. mexicanum* (lnea s3lida) del fenotipo pigmentado (A, B) y fenotipo albino (C, D), en condiciones de fotoperiodo de luz-oscuridad (LO; A, C) y de oscuridad-oscuridad (OO; B, D). Se gr3fican valores promedio \pm E.E. La lnea punteada indica el modelo de ritmo obtenido por COSINOR para ambas condiciones de luz. La barra superior en blanco-negro o negro-negro muestra el periodo de iluminaci3n LO y OO, respectivamente.

De igual forma que los organismos pigmentados, al pasar a los organismos albinos a la condici3n de OO, el comportamiento del GSH cambi3 de bimodal a unimodal con un ritmo (periodo) de 24 h ($p < 0.05$) y las mayores concentraciones de GSH

(acrofase) se registraron también durante el día subjetivo a las 9.62 h, aunque con un atraso cercano a las 2 h respecto a los organismos pigmentados; las concentraciones promedio de GSH (mesor) fueron de 1074.79 $\mu\text{mol/g PH}$, 20% menor a las obtenidas en LO ($p < 0.05$) (Tabla 2; Fig. 4C; Tabla 4). De manera similar a los organismos pigmentados, el análisis de Kruskal-Wallis no corroboró las diferencias significativas ($p < 0.05$) en las concentraciones de GSH en el cerebro del fenotipo albino a lo largo del periodo de 24 h en ambas condiciones de iluminación, LO y OO (Tabla 4).

En la comparación entre los fenotipos pigmentado y albino, el análisis de Límites de confianza de las medias poblaciones, no denotó diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los parámetros del ritmo obtenidos por el modelo COSINOR, tanto en la condición de LO como en OO, a excepción de la acrofase en los organismos pigmentados en LO ($p < 0.05$) que mostró un atraso cercano a las 2 h respecto a los albinos. No obstante, la amplitud de los ajolotes albinos, tanto en LO como en OO, registró un incremento ($p > 0.05$) del 33% y 29% respectivamente, en relación a su contraparte pigmentada

A diferencia de lo observado en GSH, el glutatión oxidado (GSSG) en el cerebro de los ajolotes pigmentados en LO mostró un comportamiento unimodal con un periodo de 23.17 h ($p < 0.05$), registrándose niveles máximos (acrofase) a las 20.34 h; los niveles promedio de GSSG fueron de 21.81 $\mu\text{mol/g PH}$ (Tabla 2; Fig. 5; Tabla 4). Al pasar a los ajolotes a una condición de libre curso en OO, durante cuatro días, el comportamiento del GSSG se mantuvo unimodal, con un periodo de 24 h ($p < 0.05$), si bien los máximos niveles (acrofase) se registraron a las 8.25 h, las mayores concentraciones de GSSG en OO se registraron durante el día subjetivo. Las concentraciones promedio de GSSG (mesor) de 20.42 $\mu\text{mol/g PH}$ fueron similares a las registradas en LO ($p > 0.05$) (Tabla 2; Fig. 5B).

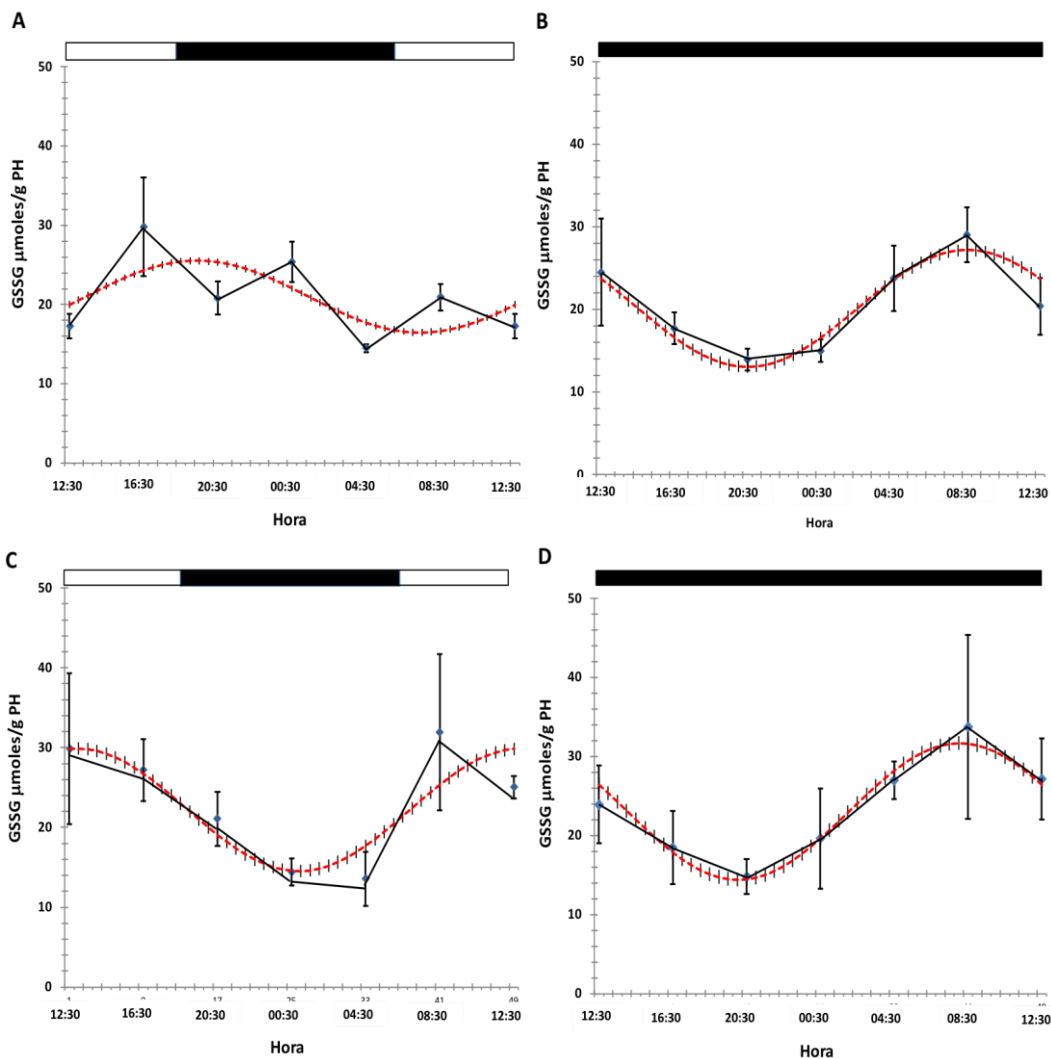


Figura 5. Ritmicidad del Glutati3n oxidado (GSSG) en el cerebro del ajolote *A. mexicanum* (l3nea s3lida), del fenotipo pigmentado (A, B) y del fenotipo albino (C, D), en condiciones de fotoperiodo de luz-oscuridad (LO; A, C) y de oscuridad-oscuridad (OO; B, D). Se gr3fican valores promedio \pm E.E. La l3nea punteada indica el modelo de ritmo obtenido por COSINOR para ambas condiciones de luz. La barra superior en blanco-negro o negro-negro muestran el periodo de iluminaci3n LO y OO respectivamente.

El an3lisis estad3stico de los par3metros determinados por el modelo COSINOR denot3 que, al pasar los ajolotes de LO a OO, la amplitud fue 22% mayor ($p < 0.05$), en tanto que la acrofase registr3 un adelanto cercano a las 12 h ($p < 0.05$) (Tabla 2). Cabe se3alar que el an3lisis de Kruskal Wallis no mostr3 diferencias significativas ($p > 0.05$) a lo largo del ciclo de 24 h en las concentraciones de GSSG en los ajolotes pigmentados mantenidos tanto en LO como en OO, lo cual puede obedecer a la

dispersión de los valores obtenidos en cada condición de iluminación (Tabla 4; Fig 2).

En el fenotipo albino en condiciones de LO, el GSSG en el cerebro presentó un comportamiento unimodal, con un periodo de 24 h ($p < 0.05$), similar al registrado en los ajolotes pigmentados; sin embargo, los niveles máximos de GSSG (acrofase) se registraron a las 14.2 h con un adelanto cerca de 6 h respecto a los organismos pigmentados ($p < 0.05$). Los valores promedio de GSSG (mesor) fueron de 20.98 $\mu\text{moles/g PH}$, similares a su contraparte pigmentada ($p > 0.05$). (Tabla 2; Figura 5C).

Al pasar a los ajolotes albinos al fotoperiodo de OO durante 4 días, el comportamiento del GSSG se mantuvo unimodal, con un ritmo (periodo) de 24 h ($p < 0.05$), similar al registrado en LO. De igual manera, los niveles promedio de GSSG (mesor) de 23.07 $\mu\text{moles/g PH}$ y el registro de los valores máximos de GSSG (acrofase) a las 8.03 h, fueron similares a los obtenidos en LO ($p > 0.05$); los mayores niveles se observaron durante el día subjetivo en OO, con un adelanto de fase cercano a las 6 h, respecto a lo observado en LO (Tabla 2; Fig. 5D; Tabla 4).

El análisis estadístico de los parámetros obtenidos por el modelo COSINOR entre los ajolotes pigmentados y albinos en LO, denotó diferencias significativas sólo en la amplitud registrada, 29% mayor en el fenotipo albino que su contraparte pigmentada ($p < 0.05$). En la condición OO, todos los parámetros fueron similares entre el fenotipo pigmentado y el albino ($p > 0.05$) (Tabla 2).

Cabe mencionar que al igual que en los organismos pigmentados, el análisis de Kruskal-Wallis (K-W) no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) a lo largo del ciclo de 24 h en las concentraciones de GSSG en los ajolotes albinos mantenidos tanto en LO como en OO, lo cual puede obedecer a su vez a la dispersión de los valores obtenidos en cada condición de iluminación (Tabla 4).

7.2.2. Ritmicidad de balance redox en el ojo de los ajolotes

El GSH en los ojos de los ajolotes pigmentados en el fotoperiodo de luz: oscuridad (LO) presentó un periodo (ritmo) unimodal de 24 h ($p < 0.05$), con las mayores concentraciones (acrofase) estimadas a las 5.43 h; las concentraciones promedio (mesor) se estimaron en 314.57 $\mu\text{moles/g PH}$ (Tabla 3; Fig. 6A).

Al colocar a los organismos en libre curso, en oscuridad constante OO, el comportamiento de GSH pasó de unimodal a bimodal, con un periodo de 12.41 h ($p < 0.05$). Las menores concentraciones que se registraron fueron asociadas con la hora de prendido y apagado subjetivo de la luz y las mayores concentraciones (acrofase) se registraron a las 12.43 h; las concentraciones promedio registradas (mesor) fueron de 329.83 $\mu\text{moles/g PH}$ (Tabla 3; Figura 6A; Tabla 5). Cabe destacar que no se observaron diferencias significativas en los parámetros del mesor y amplitud entre los fotoperiodos LO y OO ($p > 0.05$). De igual manera, la prueba de K-W no denotó diferencias significativas ($p > 0.05$) en el comportamiento temporal del GSH en el ojo de los ajolotes pigmentados, tanto en la condición LO como en OO (Tabla 5).

En los ajolotes albinos, el comportamiento del GSH tanto en LO como en OO presentó un comportamiento inverso en relación a los ajolotes pigmentados. A diferencia de los ajolotes pigmentados, en los ajolotes del fenotipo albino mantenidos en LO, el GSH registró un periodo bimodal de 11.11 h ($p < 0.05$) con las mayores concentraciones (acrofase) registradas a las 6.32 h aparentemente relacionadas con el apagado y prendido subjetivo de la luz y, concentraciones promedio (mesor) de 431.47 $\mu\text{moles/g PH}$ (Tabla 3; Fig. 6C; Tabla 5).

Al exponer a los ajolotes albinos a la condición OO, el ritmo del GSH cambió de bimodal a unimodal, con un periodo de 24 h ($p < 0.05$). La menor concentración se registró en el día subjetivo y la mayor concentración (acrofase) se registró al inicio de la noche subjetiva, a las 19.48 h, con concentraciones promedio (mesor) en el periodo de 24 h fue de 531.27 $\mu\text{moles/g PH}$ (Tabla 3; Fig. 6D; Tabla 5).

El análisis estadístico de los parámetros del modelo COSINOR entre los fotoperiodos LO y OO de los ejemplares albinos, reveló que sólo la amplitud en OO fue 6.8 veces mayor que la registrada en LO ($p < 0.05$) (Tabla 3). No obstante, el análisis de Kruskal Wallis no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) en el comportamiento temporal del GSH en el ojo de los ajolotes albinos, tanto en LO como en OO, lo cual puede obedecer a la dispersión de los resultados obtenidos (Tabla 5).

El análisis de Límites de Confianza para medias poblacionales, no denotó diferencias significativas entre los parámetros de mesor y amplitud entre los fenotipos pigmentado y albino, tanto en LO como en OO ($p > 0.05$), lo cual podría obedecer a los cambios del periodo registrado, de bimodal a unimodal (o viceversa). De tal manera, la amplitud en los ajolotes albinos en LO presentó una reducción del 75% respecto a su contraparte pigmentada; en contraste, la amplitud en OO fue 35% mayor que la registrada en los ajolotes pigmentados (Tabla 3).

En cuanto al GSSG en los ojos de los ajolotes silvestres, se registró un ritmo bimodal en LO con periodo de 12 h ($p < 0.05$), con las mayores concentraciones registradas a las 8.02 h (acrofase), asociadas al apagado y prendido de luz; la concentración promedio en el ciclo de 24 h (mesor) fue de 20.76 $\mu\text{moles/g PH}$ (Tabla 3; Figura 7A). Con el cambio de fotoperiodo de LO a OO, la expresión del ritmo cambió a unimodal con un periodo de 24 h ($p < 0.05$), donde el incremento de GSSG se registró asociado al apagado de luz y el valor máximo (acrofase) a las 2.52 h durante la noche subjetiva, con valor promedio en el ciclo de 24 h de 23.55 $\mu\text{moles/g PH}$ (Tabla 3; Figura 7B; Tabla 5).

El análisis estadístico señaló que los parámetros del ritmo de mesor y amplitud, estimados por el modelo COSINOR, fueron similares entre los fotoperiodos de LO y OO ($p > 0.05$). De manera similar, el análisis de Kruskal-Wallis no denotó diferencias significativas temporales ($p > 0.05$) en los niveles de GSSG a lo largo del ciclo de 24 h, tanto en los organismos pigmentados mantenidos en LO como en OO, lo cual puede obedecer a la dispersión de los resultados obtenidos (Tabla 5; Fig 7).

Tabla 3. Parámetros de la ritmicidad del glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) en el ojo del ajolote *A. Mexicanum* en LO y OO, obtenidos por el modelo COSINOR. Se incluyen valores promedio y de error estándar de cada parámetro ($\bar{X} \pm EE$).

Fotoperiodo	FENOTIPO	PIGMENTADO	ALBINO	PIGMENTADO	ALBINO
	Parámetros	GSH	GSH	GSSG	GSSG
LO	PERIODO (h)	24 (p = 0)	11.11 (p = 0.01)	12 (p = 0)	24 (p = 0.02)
	MESOR ($\mu\text{mol/g PH}$)	314.57 \pm 9.92	431.47 \pm 21.1	20.76 \pm 1.7 ^a	62.08 \pm 11.52 ^b
	AMPLITUD ($\mu\text{mol/g PH}$)	64.45 \pm 14.85	16.36 \pm 9.9*	9.69 \pm 2.31	50.76 \pm 16.68
	ACROFASE (h)	5.43	6.32	8.02	6.53
OO	PERIODO (h)	12.41 (p = 0.04)	24 (p = 0.03)	24 (p = 0.04)	12 (p = 0.03)
	MESOR ($\mu\text{mol/g PH}$)	329.83 \pm 24.6	531.27 \pm 47.2	23.55 \pm 3.2 ^a	52.32 \pm 1.95 ^b
	AMPLITUD ($\mu\text{mol/g de PH}$)	71.99 \pm 34.25	111.14 \pm 64.2*	5.03 \pm 4.76	29.74 \pm 2.78
	ACROFASE (h)	12.43	19.48	2.52	7.93

El * indica diferencias significativas ($p < 0.05$) para un mismo parámetro entre los fotoperiodos LO y OO de un mismo fenotipo.

Las letras superíndices diferentes indican diferencias significativas para un mismo parámetro ($p < 0.05$), entre los fenotipos para una misma condición de iluminación.

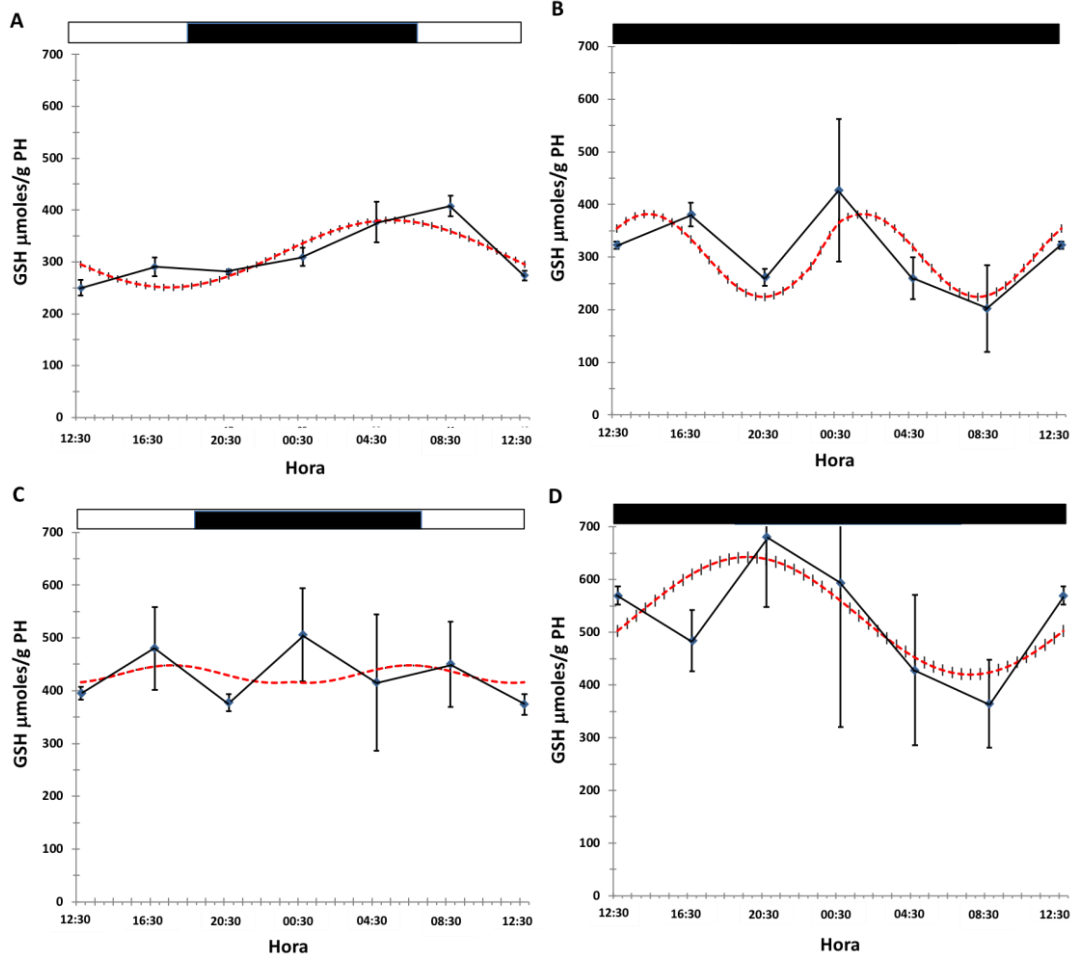


Figura 6. **Ritmicidad del Glutatión reducido (GSH)** en ojos del ajolote *A. mexicanum* (línea sólida), del fenotipo pigmentado (A, B) y fenotipo albino (C, D), en condiciones de fotoperiodo de luz-oscuridad (LO; A, C) y oscuridad-oscuridad (OO; B, D). Se grafican valores promedio \pm E.E. La línea punteada indica el modelo de ritmo obtenido por COSINOR para ambas condiciones de luz. La barra superior en blanco-negro o negro-negro muestran el periodo de iluminación LO y OO, respectivamente.

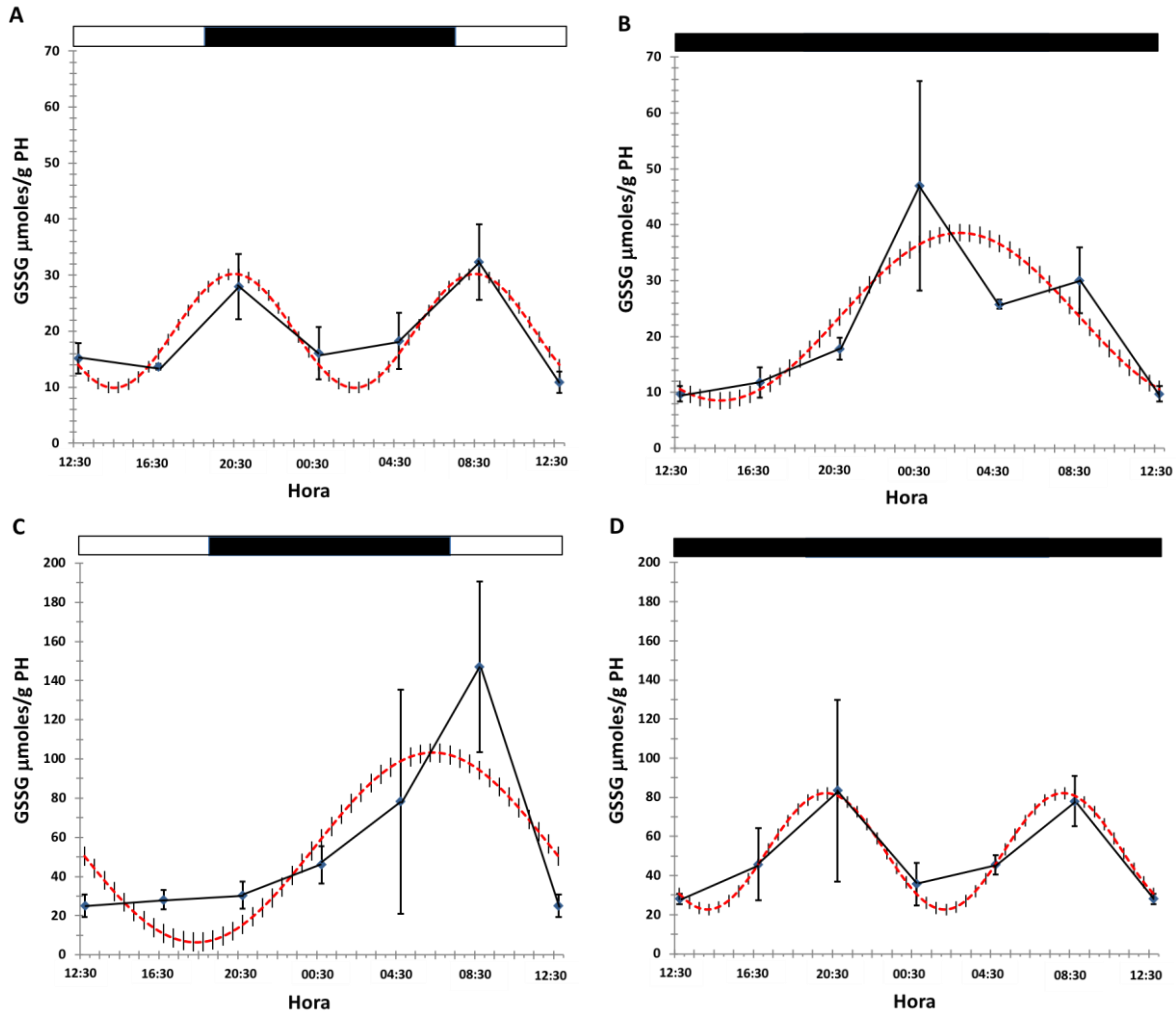


Figura 7. **Ritmicidad del Glutati3n oxidado (GSSG)** en el ojo del ajolote *A. mexicanum* (l3nea s3lida), del fenotipo pigmentado (A, B) y fenotipo albino (C, D), en condiciones de fotoperiodo de luz- oscuridad (LO; A, C) y oscuridad-oscuridad (OO; B, D). Se grafican valores promedio \pm E.E. La l3nea punteada indica el modelo de ritmo obtenido por COSINOR para ambas conciciones de luz. La barra superior en los gr3ficos en blanco-negro o negro-negro muestran el periodo de iluminaci3n LO y OO respectivamente.

A diferencia de lo observado en los ojos de los ajolotes pigmentados en LO, el GSSG en los ajolotes albinos present3 un ritmo unimodal con un periodo de 24 h ($p < 0.05$), con el incremento en los niveles de GSSG asociado al apagado de la luz y niveles m3ximos (acrofase) registrados a las 6.53 h; los valores promedio se estimaron en $62.08 \mu\text{moles/g PH}$ (Tabla 3; Figura 4C). Al colocar a los organismos en libre curso en OO, el comportamiento de GSSG pas3 de unimodal a bimodal, con un periodo de 12 h ($p < 0.05$) y tendencias similares a los exhibidos en los ajolotes silvestres en LO. La mayor concentraci3n de GSSG (acrofase) se registr3

a las 7.93 h, con niveles promedio en el ciclo de 24 h de 52.32 μ moles/g PH. El análisis estadístico de los parámetros de mesor y amplitud, estimados por el modelo COSINOR, no denotó diferencias significativas entre los fotoperiodos LO y OO ($p>0.05$). De manera similar, el análisis de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas temporales durante el ciclo de 24 h ($p>0.05$) tanto en LO como en OO.

Al comparar las concentraciones de GSSG en los ojos de los ajolotes entre los dos fenotipos, en las mismas condiciones de iluminación, el análisis estadístico reveló diferencias significativas ($p<0.05$) para sólo el parámetro mesor, de 3 y 2.2 veces mayor en los ajolotes albinos en LO y OO en relación a su contraparte pigmentada. Cabe destacar que las diferencias en cuanto a magnitud pueden obedecer a los cambios del ritmo (periodo) registrado, de bimodal a unimodal (o viceversa). Así entonces, también la amplitud en los ajolotes albinos fue 5.2 y 5.9 veces mayor en LO y OO, respecto a los ajolotes pigmentados ($p>0.05$) (Tabla 3).

7.2.3. Razón GSH/GSSG en Cerebro y Ojos

A partir de los resultados obtenidos de GSH y GSSG se calculó la razón GSH/GSSG que aporta información integradora del estado redox celular. En el cerebro de los ajolotes mantenidos en el fotoperiodo LO, no se registraron diferencias significativas en la razón entre el periodo diurno y el nocturno ($p>0.05$) tanto en los ejemplares pigmentados como en los albinos (Tabla 4). En los organismos pigmentados en LO, los valores promedio fueron de 56.4 y 69.41 para el periodo diurno y nocturno, mientras que en los albinos fueron de 53.73 y 84.73, respectivamente. De manera similar en OO, la razón GSH/GSSG fue similar en el cerebro de los organismos pigmentados y albinos en los periodos subjetivos de luz y oscuridad ($p>0.05$); en los ejemplares pigmentados los valores promedio fueron de 51.36 y 53.34 para el día y la noche subjetiva, mientras que en los albinos fueron de 51.54 y 52.20, respectivamente.

Al igual que en el cerebro, la razón GSH/GSSG en el ojo de los ajolotes no se registraron diferencias significativas entre el periodo diurno y el nocturno ($p>0.05$)

tanto en los ejemplares pigmentados como en los albinos, si bien se registró una mayor variación en los resultados obtenidos (Tabla 5). En los organismos pigmentados en LO, los valores promedio fueron de 20.93 y 19.94 para el periodo diurno y nocturno, mientras que en los albinos fueron de 13.86 y 15.02, respectivamente. De igual manera en OO, la razón GSH/GSSG fue similar en los organismos pigmentados y albinos en los periodos subjetivos de luz y oscuridad ($p>0.05$), en los ejemplares pigmentados los valores promedio fueron de 29.94 y 15.94 para el día y la noche subjetiva, mientras que en los albinos fueron de 12.28 y 38.95, respectivamente.

Tabla 4. Concentración ($\mu\text{moles/g PH}$) de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) en el cerebro de *A.mexicanum* en los fenotipos pigmentado y albino, determinados cada 4 h en un ciclo de 24 h, así como la razón GSH/GSSG calculada. Se señalan valores promedio \pm EE. Nn= 35 An=23

Iluminación	Etiqueta	Tiempo (h)	GSH ($\mu\text{moles/g PH}$)		GSSG ($\mu\text{moles/g PH}$)		GSH/GSSG	
			Pigmentado	Albino	Pigmentado	Albino	Pigmentado	Albino
LO	1	12:30	1082.58 \pm 38.9	1438.98 \pm 32.5	17.27 \pm 1.53	29.87 \pm 9.45	54.10 \pm 9.79	57.06 \pm 11.02
	2	16:30	1426.95 \pm 86.53	1591.45 \pm 222.7	29.8 \pm 6.2	27.187 \pm 3.88	54.82 \pm 8.35	64.26 \pm 15.57
	3	20:30	1256.53 \pm 23.93	1207.98 \pm 24	20.82 \pm 2.1	21.079 \pm 3.4	62.17 \pm 4.60	59.63 \pm 7.45
	4	00:30	1279.37 \pm 72.05	1219.62 \pm 89	25.4 \pm 2.57	14.40 \pm 1.7	50.44 \pm 5.63	85.64 \pm 3.544
	5	04:30	1337.25 \pm 48.4	1364.01 \pm 268.37	14.5 \pm 1.5	13.56 \pm 3.38	95.63 \pm 9.03	108.93 \pm 15.37
	6	08:30	1251.01 \pm 124.7	1206.58 \pm 41.96	20.92 \pm 1.67	31.95 \pm 9.77	54.82 \pm 3.40	46.71 \pm 10.48
	7	12:30	1082.58 \pm 38.9	1438.98 \pm 32.5	17.27 \pm 1.53	25.05 \pm 1.4	64.95 \pm 7.15	43.38 \pm 9.50
		Media \pm EE		1287.38 \pm 24.92	1258.03 \pm 46.91	22.73 \pm 1.76	21.95 \pm 1.92	62.43 \pm 2.02
OO	1	12:30	1106.19 \pm 52.05	1295.83 \pm 64	24.51 \pm 6.46	23.93 \pm 4.94	58.93 \pm 13.6	50.02 \pm 8.74
	2	16:30	1092.10 \pm 64.72	1040.21 \pm 62.04	17.72 \pm 1.9	18.5 \pm 4.64	63.45 \pm 5.04	61.08 \pm 7.53
	3	20:30	965.13 \pm 24.99	923.01 \pm 55.9	13.94 \pm 1.34	14.8 \pm 2.23	72.52 \pm 9.03	67.75 \pm 11.66
	4	00:30	784.25 \pm 37.34	690.97 \pm 167.53	15.01 \pm 1.34	19.63 \pm 6.35	50.11 \pm 4.80	37.12 \pm 4.82
	5	04:30	1012.06 \pm 188.4	1377.35 \pm 79.8	23.76 \pm 3.94	27.03 \pm 2.38	37.39 \pm 4.24	51.73 \pm 4.20
	6	08:30	1152.78 \pm 100.64	1232.22 \pm 78.28	29.04 \pm 3.34	33.75 \pm 11.61	35.11 \pm 10.05	43.12 \pm 7.44
	7	12:30	1106.19 \pm 52.05	1295.83 \pm 64	20.37 \pm 3.45	27.16 \pm 5.16	52.13 \pm 10.05	50.85 \pm 6.64
		Media \pm EE		1072.23 \pm 43.55	1118.19 \pm 45.39	29.12 \pm 1.58	23.14 \pm 2.28	52.81 \pm 2.97

Tabla 5. Concentración (umoles/g PH) de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) en los ojos de *A. mexicanum* en los fenotipos pigmentado y albino, determinados cada 4 h en un ciclo de 24 h así como la razón GSH/GSSG calculada. Se incluyen valores promedio \pm E.E. Nn= 35 An=23

Iluminación	Etiqueta	Tiempo	GSH (umoles/g PH)		GSSG (umoles/g PH)		Razón GSH/GSSG	
			Fenotipo		Fenotipo		Fenotipo	
			Pigmentado	Albino	Pigmentado	Albino	Pigmentado	Albino
LO	1	12:30	250.21 \pm 14.63	395.19 \pm 11.56	15.12 \pm 2.70	24.91 \pm 5.74	19.41 \pm 6.33	17.17 \pm 2.20
	2	16:30	290.18 \pm 18.14	480.12 \pm 78.25	13.65 \pm 0.47	28.09 \pm 5.0	24.56 \pm 2.44	19.15 \pm 4.61
	3	20:30	280.79 \pm 4.50	377.40 \pm 16.13	28 \pm 5.10	30.41 \pm 6.81	12.20 \pm 3.290	15.92 \pm 4.88
	4	00:30	309.50 \pm 17.43	505.89 \pm 87.76	16.06 \pm 4.64	45.94 \pm 9.47	29.57 \pm 9.61	12.08 \pm 2.77
	5	04:30	377.11 \pm 39.18	415.92 \pm 129.15	18.22 \pm 5.0	78.27 \pm 57.20	18.04 \pm 2.27	17.06 \pm 6.23
	6	08:30	407.76 \pm 20.14	450.11 \pm 80.55	32.31 \pm 6.77	147.12 \pm 43.5	14.91 \pm 5.28	5.27 \pm 2.21
	7	12:30	273.86 \pm 9.59	373.97 \pm 20.10	10.89 \pm 1.87	24.91 \pm 5.74	27.20 \pm 8.07	17.17 \pm 2.20
	Media \pm EE		312.77 \pm 21.89	428.38 \pm 19.50	19.18 \pm 2.99	54.24 \pm 17.07	20.85 \pm 2.41	14.83 \pm 1.38
OO	1	12:30	322.91 \pm 6.96	569.6 \pm 117.10	9.75 \pm 1.40	28.12 \pm 2.65	32.32 \pm 5.91	20.42 \pm 3.20
	2	16:30	380.67 \pm 22.16	484.41 \pm 57.80	11.78 \pm 2.73	45.70 \pm 18.46	50.02 \pm 22.89?	14.99 \pm 5.13
	3	20:30	261.63 \pm 16.30	680.63 \pm 133.10	17.82 \pm 1.97	83.45 \pm 46.41	18.16 \pm 2.74	89.33 \pm 54.39
	4	00:30	426.64 \pm 135.27	592.92 \pm 272.30	46.99 \pm 18.74	35.68 \pm 10.84	16.09 \pm 6.44	17.30 \pm 4.07
	5	04:30	259.49 \pm 39.97	428.06 \pm 142.50	25.77 \pm 0.83	45.51 \pm 5.0	13.57 \pm 2.84	10.23 \pm 3.11
	6	08:30	202.5 \pm 82.31	364.52 \pm 83.94	30.05 \pm 5.92	78.08 \pm 12.80	7.10 \pm 1.94	5.79 \pm 2.20
	7	12:30	322.91 \pm 6.96	569.6 \pm 117.10	9.75 \pm 1.40	28.12 \pm 2.65	33.095.91	11.73 \pm 4.96
	Media \pm EE		310.96 \pm 29.02	527.11 \pm 40.70	21.71 \pm 5.18	49.24 \pm 8.60	24.23 \pm 6.14	24.25 \pm 16.19

8. DISCUSIÓN

..

8.1. Ritmicidad circadiana del balance redox en cerebro

Los resultados obtenidos en el presente estudio, demuestran la ritmicidad circadiana del glutatión (GSH y GSSG) en el cerebro de *A. mexicanum* en los dos fenotipos estudiados, pigmentado y albino, se corrobora con los parámetros de ritmicidad evaluados por el modelo COSINOR tanto en LO como en OO. Esta ritmicidad sugiere la presencia de un control endógeno del ritmo, dado que al mantenerse en curso libre durante 96 h en OO se mantiene la expresión circadiana del GSH y GSSG en ambos fenotipos. El comportamiento circadiano del glutatión en el cerebro ha sido descrito ampliamente en ratas (Navigatore-Fonzo *et al.*, 2014; Baydas *et al.*, 2002; Diaz-Muñoz 1985) y en otros grupos no mamíferos, como en la mosca de la fruta *Drosophyla melanogaster* (Beaver *et al.*, 2012), en el pollo (Pablos *et al* 1998) y en el cangrejo *Procambarus clarkii* (Fanjul-Moles *et al.* 2003). En anfibios se corroboró con la evaluación de los genes de las enzimas antioxidantes (SOD1, SOD2,CAT y GPx) en la rana *Quasipaa spinosa* (Xie *et al.* 2022).

En *Ambystoma mexicanum*, el período del GSH y el GSSG de ambas condiciones de iluminación, LO y OO, es similar en los dos fenotipos, donde el GSH fue bimodal en LO y unimodal en OO, mientras que el GSSG se mantuvo unimodal en ambas condiciones de iluminación. Bajo el régimen de LO, la acrofase del GSH demuestra una sincronía con el fotoperiodo, ya que ocurre previo al encendido y apagado de la iluminación, aunque, el fenotipo albino presentó un adelanto de fase de 2.30 h en LO y cercano a las 3 horas en OO.

El adelanto de fase de los ajolotes albinos podría estar relacionado con su conducta, es decir, que estén siguiendo estrategias diferentes a la de los ajolotes pigmentados para, por ejemplo, evadir depredadores; dichas diferencias podrían estar relacionadas con la expresión del ritmo del glutatión, pues su expresión circadiana se relaciona con la actividad neuronal del tejido, el cual está relacionado a su vez con el estado metabólico global del organismo (estado redox; Milev y Reddy, 2015;

Guillette y Wang, 2014), así como con su actividad locomotora y de alimentación (Hardeland *et al.*, 2003). Es posible sugerir que el comportamiento circadiano del glutatión en el cerebro de los ajolotes de fenotipo pigmentado y albino se relacione en parte con los ciclos diurnos de su actividad locomotora, de alimentación y de consumo de oxígeno, que si bien en este estudio no se evaluaron, en otros estudios sí (Valdez-Caro, 2019; Prieto-Sagredo, 2023, comunicación personal), los cuales se podrían relacionar con lo obtenido en este estudio, ya que el cambio en la actividad de los organismos, influye en la demanda metabólica y por ende la actividad neuronal del cerebro (Zhang *et al.*, 2019)

El periodo del GSH y GSSG mencionado anteriormente en cerebro de ambos fenotipos durante la condición de O:O, confirmó la ritmicidad circadiana del sistema del glutatión, ya que su duración fue de 24 horas aún después de 96 hr de mantenerlos en la condición de oscuridad continua. El GSH, en comparación con lo observado en LO, presenta niveles más bajos, este comportamiento coincide con lo encontrado en *Procambarus clarkii* por Fanjul *et al.*, 2008; de igual forma, se reporta esta misma tendencia en O:O en la actividad locomotora de juveniles de *A. mexicanum* pigmentados y aun cuando en el estudio de Valdez-Caro (2019) no se evaluó la ritmicidad del sistema glutatión, se sabe que la actividad locomotora está relacionada con la actividad metabólica global (Valdez-Caro 2019).

Hay que tener presente que el alimento también es un Zeitgeber para la actividad rítmica del organismo, por lo que el uso de un horario restringido de alimentación para los ajolotes utilizados en este estudio mantuvo una constante en la sincronización de su actividad metabólica relacionado al estímulo en la actividad locomotora de los ajolotes para la búsqueda del alimento proporcionado, lo cual es parte de lo observado por Valdez-Caro (2019), sin embargo de acuerdo con Rudic y colaboradores (2004), las dietas asincrónicas pueden modificar la homeostasis de la glucosa en ratones mediante la desvinculación del oscilador central (NSQ) con los relojes periféricos (en este caso el hígado como generador de glucosa), debido a que se puede alterar el ritmo de los genes que controlan los ciclos metabólicos

afectando los niveles de glucosa y ácidos grasos, alterando así el estado energético celular por cambios en las proporciones AMP/ATP (Damiola et al., 2000) y dado que el cerebro, por su función, requiere un aporte constante de glucosa para su actividad energética (Lehninger et al., 2007), una alimentación asincrónica puede modificar la aportación de glucosa y por ende la respuesta metabólica del mismo, alterando el balance redox y por ende el ciclo del glutatión, ocurriendo que no se diese de manera circadiana o no se viese de manera clara un ciclo como tal.

Si bien el periodo del GSH y GSSG tuvo la misma duración en ambos fenotipos en OO, los parámetros del ritmo en esta condición son relativamente diferentes. La amplitud del GSH y GSSG de los ajolotes albinos es 28 y 13% mayor (respectivamente) que en los pigmentados, de igual modo, la acrofase del GSH de los albinos presenta un adelanto con respecto a los pigmentados, de manera similar al fotoperiodo de LO; sin embargo, la acrofase del GSSG ocurre casi en el mismo horario, además de que los ajolotes pigmentados tuvieron un aumento significativo de su amplitud en OO. Este comportamiento coincide con la tendencia encontrada por Fanjul et al., 2008 en *P. clarkii*, donde la amplitud de GSSG en OO tiene un aumento de alrededor de 3 veces con respecto a la condición de LO. Es claro que el cambio de fase en los fenotipos de los ajolotes demuestra la naturaleza circadiana del sistema glutatión y al parecer este cambio en las fases está relacionado a la actividad normal de los ajolotes.

De esta forma, no se encontraron diferencias en la concentración y el período del sistema glutatión entre ambos fenotipos, pero sí en los otros parámetros del ritmo, además de la duración de todo el ciclo de glutatión, es decir, el tiempo en que el glutatión reducido se oxida y vuelve a reducirse de nuevo, en la condición de luz-oscuridad es más rápido el ciclo del glutatión en los ajolotes albinos (de 11 horas), mientras que en los pigmentados es de 15 horas. En OO, la duración de los ciclos de ambos fenotipos es más larga que lo observado en LO; en los albinos la duración fue mayor (de 22 horas) que en los pigmentados (de 18 horas). Aunque no hay estudios de los efectos de la luz en el sistema antioxidante de anfibios albinos, los

resultados obtenidos concuerdan parecido con lo encontrado por Possidente (1982) en ratones, donde el período de actividad locomotora de ratones albinos es más corto que en ratones pigmentados.

Podemos decir entonces con mayor seguridad que el ritmo unimodal del GSSG y bimodal del GSH observando en el cerebro de *A. mexicanum* del fenotipo pigmentado y albino pudiera estar relacionada, con su actividad locomotora y búsqueda de alimento, pero con diferentes estrategias cada uno, donde los ajolotes pigmentados están más activos en la tarde-noche, mientras que los albinos son más diurnos (mañana-tarde).

La condición redox en el cerebro de los ajolotes pigmentados y albinos es adecuada dado el comportamiento desplegado de la relación GSH/GSSG, donde se espera que la forma reducida del glutatión ocupe del 90 al 99% del glutatión total presente en el tejido (Circu y Aw, 2010) y la razón observada cae dentro de este intervalo manteniéndose constante.

8.2. Ritmicidad circadiana del balance redox en ojos

Los resultados de este estudio confirman que también se presenta el control temporal del glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en los ojos del ajolote *A. mexicanum*, tanto en los organismos pigmentados como en los albinos y en los dos fotoperiodos evaluados, pues se expresan ritmos circadianos significativos, corroborado con los modelos obtenidos por el análisis de COSINOR.

Al ser los ojos un área de entrada de información fótica al sistema nervioso central, ellos proporcionan la señalización necesaria en forma de imágenes o censando la luz ambiental para la organización temporal del sistema nervioso central, proceso que ha sido estudiado en diferentes grupos de vertebrados a nivel morfológico, electrofisiológico, bioquímico, genético y metabólico (Xie *et al.*, 2022; Fanjul- Moles 2008; Chiba *et al.*, 2005; Green y Besharse, 2004; Underwood 2001; Anderson *et al.*, 2000; Cahill y Besharse, 1995). Hasta donde se ha revisado en literatura, este

es el primer estudio en el que se reporta la ritmicidad circadiana a nivel bioquímico del sistema glutatión en los ojos de los ajolotes *A. mexicanum*.

En anfibios se ha descrito un sistema multi oscilatorio compuesto por la glándula pineal, NSQ del hipotálamo, los ojos y los fotorreceptores extrarretinales (Yoshikawa y Oishi, 1998). Dependiendo de la especie, cada órgano que compone este sistema tiene diferente jerarquía en cuanto al control y mantenimiento de la ritmicidad del organismo (Konishi *et al.*, 1985; Underwood *et al.*, 1984; Underwood 1994). Esto se ha corroborado en *Cynops pyrrhogaster* (salamandra vientre de fuego) en el que la pinealectomía anuló el ritmo de la actividad locomotora mientras que una enucleación ocular tuvo poco efecto en el período en libre corrimiento (Chiba *et al.*, 1993), en este organismo, por ejemplo, la pineal tiene más influencia en el ritmo de actividad locomotora que lo que tienen los ojos.

La salida de los ritmos de ambas formas del glutatión es distinta entre los fenotipos pigmentado y albino. Por un lado, la amplitud del GSH de los albinos es significativamente menor (4 veces) en comparación con el de los ajolotes pigmentados, es decir, los niveles de GSH se mantienen oscilando en valores relativamente diferentes con el fin de contrarrestar la diferente cantidad de ROS que se producen entre los fenotipos con el encendido de la luz, lo cual se supone mayor en el fenotipo albino. En los ajolotes pigmentados, el GSH y GSSG en LO presentó un ritmo unimodal y bimodal respectivamente, mientras que para los ajolotes albinos se presentó una inversión de fase, donde la ritmicidad del GSH y el GSSG fue bimodal y unimodal respectivamente.

El comportamiento de GSH se relaciona con los valores de GSSG cuyo incremento podría relacionarse de manera normal con el encendido de la luz por la actividad mitocondrial de los conos (Chang *et al.*, 2018; Matthews *et al.*, 1990). Es notorio que en los ajolotes albinos la magnitud de la amplitud del GSSG fue casi 5 veces mayor que en los ajolotes pigmentados, lo cual puede deberse a la falta de melanina en los ojos de los albinos ya que su función es la captura de los fotones que no son

capturados por los fotorreceptores para evitar un foto-daño oxidativo en la retina (Boulton *et al.*, 2001; Sarna 1992).

Los resultados obtenidos sugieren que la actividad del ojo en ambos fenotipos está sincronizada con la luz, ya que el incremento de la actividad del GSH como del GSSG que se presentan previo al encendido y apagado de la luz, denotando que los ritmos del ojo modulan la sensibilidad visual y la adaptación a la luz para contrarrestar un posible fotodaño oxidativo por cambios en la intensidad lumínica, tal como ha sido descrito para otros vertebrados (Underwood 2001; Organisciak, 1994).

De esta forma, en los ajolotes albinos, la luz pudiera estar sobre-estimulando algunos procesos en la retina como lo es la muda del disco de los conos y bastones y por ende la fagocitosis en el epitelio retinal pigmentado que ocurre previo al encendido de luz (LaVail, 1980) y con ello, el requerimiento metabólico para este proceso estaría afectando la magnitud del estrés oxidativo entre los fenotipos, siendo mayor en los albinos.

Los resultados de la ritmicidad del GSH y GSSG en los ojos de los organismos colocados en libre curso (OO) denotan el componente endógeno del ritmo circadiano, tanto en los organismos pigmentados como en los albinos al expresar un comportamiento circadiano (24 h). Se ha reportado que algunos procesos llevados a cabo en el ojo como la síntesis de melatonina-dopamina, la presión intraocular y la actividad fagocítica en las diferentes estructuras oculares exhiben ritmicidad circadiana de 24 h (Tsuchiya *et al.*, 2017; Lozano *et al.*, 2015; Cahill y Besarse 1991; LaVail 1980). En *A. mexicanum* es posible que la expresión bimodal (ultradiana) obedezca a variables que puedan estar enmascarando o modulando los resultados, dado que se analizaron los ojos completos y la señal principal del ritmo se expresa de forma coherente en los conos y bastones de la retina; de tal manera que los resultados obtenidos reflejarían la sumatoria de los niveles del glutati6n que

se presenta en cada estructura del ojo, como lo es el cristalino y el humor vítreo (Mackic *et al.*, 1996; Reddy 1990).

Por otro lado, el GSH y el GSSG de los ajolotes pigmentados en libre curso, también exhibieron un cambio de fase, a bimodal y unimodal respectivamente. Este cambio de expresión del ritmo con el cambio de fotoperíodo coincide con lo encontrado en el ritmo del sistema glutatión de la retina de *P. clarkii* en el que se expresaron ritmos bimodales y unimodales (Fanjun-Moles *et al.*, 2008).

La falta de melanina en los ojos de ratas y ratones albinos ha demostrado tener efectos a nivel de sensibilidad y funciones visuales, pues en estos organismos ocasiona una baja agudeza visual y un umbral visual elevado en comparación con las ratas pigmentadas (Balkema, 1988; Balkema y Drager, 1991; Balkema *et al.*, 2001), así como una disminuida sensibilidad al contraste (Birch y Jacobs, 1979) y respuestas pupilares bajas y lentas a la luz (Green *et al.*, 1994). En los ajolotes albinos es posible que manifiesten una mayor sensibilidad a la luz que los pigmentados, pues en OO se incrementó la amplitud del GSH en mayor medida que en LO.

Aunque la intensidad de la luz a la que se expusieron a los ajolotes (ambos fenotipos) es la misma, en los albinos, por la menor cantidad de melanina, la cantidad de luz necesaria para estimular los ojos es menor que en los pigmentados, lo cual también se ve reflejado en la amplitud del GSSG entre ambos fenotipos; siendo entonces que la intensidad de la luz a la que los animales son expuestos y la sensibilidad a la luz, determinó posteriormente la longitud del ritmo en condiciones de libre curso como es explicado por Aschoff (1960), esto puede explicar la diferencia de amplitudes del sistema glutatión en los ajolotes.

De igual forma, se encontró que en codornices albinas hay una menor concentración de melatonina en plasma y retina (Lauber *et al.*, 1989), dicha situación podría estar ocurriendo también en los ajolotes albinos dado que la expresión del ritmo del

sistema de glutatión fue diferente entre los fenotipos albino y pigmentado. La melatonina induce cambios fisiológicos en la retina que tienen que ver con la adaptación a la oscuridad (i.e elongación de los conos, la muda de disco de los bastones, sensibilidad visual, etc.) (Pierce *et al.*, 1985; Barnard *et al.*, 2006; Cameron *et al.*, 2008; Storch *et al.*, 2007), entonces una posible ausencia o baja producción de melatonina en los ojos de ajolotes albinos podría estar influyendo en la actividad de la retina y, con ello, los requerimientos metabólicos necesarios para los cambios fisiológicos de la retina para su adaptación y por ende, la respuesta del sistema glutatión pueda estar determinado por los niveles de melatonina y resultar en una diferente expresión-del ritmo entre los fenotipos.

Dada la variabilidad individual que presentaron los ajolotes de cada fenotipo durante el presente estudio, determinó que no se observaran diferencias significativas entre los niveles promedio de glutatión a lo largo del ciclo de 24 h de entre los fenotipos, por lo que las diferencias la determinó la salida del ritmo como un mecanismo de respuesta adaptada a los ROS generados normalmente en cada fenotipo. Sucede algo parecido a la adaptación de la respuesta de mecanismos de protección celular en otros organismos acuáticos, como es en el caso del cangrejo de barro *N. granulata* en los cuales, los efectos por la exposición a la luz UV y la consecuente formación de radicales peroxilo y el nivel de actividad de la catalasa no difirió con respecto al grupo control (Vargas *et al.*, 2010), lo cual habla de la robustez del sistema para evitar la generación de un daño; en el caso de la rana bermeja *R. temporaria* expuestas a luz intensa, se observó que puede aumentar el estrés oxidativo en el ojo pero, se mantiene una regulación compensatoria positiva de la actividad de las enzimas antioxidantes en los ojos (Yusifov 2000). Esta compensación de la actividad del sistema glutatión en el ojo de los ajolotes se puede observar con el indicador de estrés oxidante, la relación GSH/GSSG, el cual al mantenerse sin cambio significativo a lo largo del ciclo de 24h, en las dos condiciones de luz y los dos fenotipos, no evidenció del posible estrés en los ojos de los ajolotes albinos, por lo que no fue un indicador adecuado para este estudio. Por otro lado, es posible suponer que en *A. mexicanum* el SNC es suficientemente robusto para el mantenimiento general de los ritmos circadianos periféricos y sean

los ojos los que probablemente aporten menos al control del sistema circadiano, como se ha observado en otros organismos (Yusifov 2000; Fanjun-Moles *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2010). Esta condición también puede asociarse con adaptaciones particulares del ajolote a su hábitat y a la recepción de estímulos; en este sentido, cabe precisar que la visión de *A. mexicanum* en su hábitat es pobre dada su actividad crepuscular-nocturna (Robles-Mendoza 2011), debido a que la búsqueda del alimento responde más a un comportamiento de “espera y ataca” (sit and wait; Wells 2007), donde la percepción de sus presas es por vibración más que por estímulos químicos o visuales (Alcaráz *et al.*, 2015; Werner y Anholt, 1993; Skelly, 1994).

Pese a que se ha reportado que en mamíferos la falta de melanina se relaciona con modificaciones en la expresión conductual, de funciones visuales y circadianas, en *A. mexicanum*, esta condición no demostró presentar un efecto o alteración clara de estrés oxidante en los tejidos estudiados; aunque por las diferencias observadas a nivel conductual, encontramos una relación con los parámetros del ritmo, además de que la respuesta del sistema de glutatión se mantuvo muy bien conservada.

Teniendo en cuenta la robustez de la maquinaria antioxidante que se encuentran en los tejidos relacionados con el control circadiano del organismo, los resultados obtenidos en este estudio en los ojos y en el cerebro, brindan la capacidad a los organismos de adaptarse ante cambios fisiológicos-morfológicos para el mantenimiento de sus ritmos sin que tengan una importante alteración de los mismos que pueda comprometer la sobrevivencia del organismo desde el punto de vista funcional.

Desde el punto de vista ecológico, la fragmentación del hábitat de *A. mexicanum*, Xochimilco, ha ocasionado una serie de alteraciones y problemáticas a la especie como lo es una reducción severa de su tamaño poblacional (Zambrano, 2004), con una consecuente reducción de su heterogeneidad silvestre, que lo lleva además a una endogamia poblacional lo cual incide en el nacimiento de generaciones de ajolotes albinos por la mayor probabilidad de expresión de los genes recesivos del

albinismo (Summers, 2009; Humphrey, 1967), entre otros genes que pueden resultar contraproducentes a la especie. Estas alteraciones del hábitat, además de la problemática de contaminantes presentes, hay alteraciones en la transparencia del agua (incremento de su turbidez por partículas suspendidas) (Mathis y Vincent, 2000; Gayosso-Morales *et al.*, 2017), mayor cobertura de áreas de bloqueo solar (por el lirio acuático; Carrión *et al.*, 2012) lo cual genera condiciones de penumbra, repercutiendo en la actividad circadiana del ajolote; vemos como cambia el ritmo circadiano en ojos y cerebro cuando se colocan en condiciones de oscuridad continua en pocos días; dicha alteración de la actividad de los organismos, controlado por su actividad circadiana, puede también repercutir en su sobrevivencia, tanto pigmentados como albinos (más en estos últimos), por ejemplo en ser presas más fáciles de depredadores exóticos como lo son la tilapia y la carpa. En cuanto al efecto del albinismo en la conducta de cortejo y la reproducción, hasta el momento no se encontró algún estudio sin embargo es posible suponer que no lo tenga dado que *A. mexicanum* depende principalmente de señales quimiosensoriales tanto para la reproducción como para la caza (Park *et al.* 2004; Alcaráz *et al.*, 2015) por lo que no notarían el fenotipo de su congénere.

9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se confirma la presencia de ritmicidad circadiana del sistema glutatión en el cerebro y ojos del ajolote *Ambystoma mexicanum* en el fenotipo pigmentado y albino.

En el cerebro, los periodos de ambos fenotipos son similares en GSH y GSSG, aunque en albinos presenta fase adelantada al encendido de la luz y periodo más corto, lo cual puede estar relacionada a su actividad y demanda energética neuronal.

La ritmicidad circadiana del cerebro en ambos fenotipos solo difieren en su amplitud, siendo mayor en albinos.

La falta de melanina de los albinos no influye en el comportamiento y actividad oxidativa en el cerebro.

La condición redox en el cerebro de ambos fenotipos es similar y adecuada a un estatus normal.

La expresión circadiana del glutatión en los ojos de ambos fenotipos está relacionada y sincronizada a la luz ambiental que recibe.

En el ojo de los ajolotes albinos, esta ritmicidad posee componentes ultradianos y mayor amplitud dada su sensibilidad visual.

La amplitud del GSH es menor y mayor en el GSSG en los ajolotes albinos a comparación de los ajolotes pigmentados para contrarrestar los ROS producidos por la luz incidente y actividad mitocondrial de manera más rápida por la falta de melanina ocular, principalmente al encendido de la luz, con ello pueden mantener un estrés oxidativo bajo en el ojo.

La condición redox en los ojos de ambos fenotipos de manera general, es similar y adecuada a un estatus normal dadas las estrategias que se observaron en los componentes del ritmo en ambos fenotipos.

10. LITERATURA CITADA

- Alcaraz, G., López-Portela, X. y Robles-Mendoza, C., 2015, Response of a native endangered axolotl, *Ambystoma mexicanum* (Amphibia), to exotic fish predator. *Hydrobio.* 753, 73–80, <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2194-4>.
- Álvarez, I., y Tendillo, F. J., 2010, Métodos de anestesia, analgesia y eutanasia. Manual de prácticas. Madrid, España: COEDI. Revisado en internet el 10-09-23 en <https://www.unrc.edu.ar/unrc/coedi/docs/guia-anestesia-eutanasia.pdf>
- Anderson F. E., y Green C. B., 2000, Symphony of rhythms in the *Xenopus laevis* retina. *Microsc Res Tech.*1; 50(5):360-72. DOI: 10.1002/1097-0029(20000901)50:5<360::AID-JEMT5>3.0.CO;2-B. PMID: 10941172.
- Anguiano, O.L., Caballero de Castro, A. y Pechen de D'Angelo, A.M. 2001, The role of glutathion conjugation in the regulation of early toad embryos' tolerance to pesticides, *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 128(1):35-43. DOI: 10.1016/s1532-0456(00)00174-5.
- Arauz J., Ramos-Tovar E. y Muriel P., 2016, Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside, *Ann Hepatol.*, 15(2):160-73. DOI: 10.5604/16652681.1193701.
- Arroyo, V. S., Flores, K. M., Ortiz, L. B., Gómez-Quiroz, L. E., y Gutiérrez-Ruiz, M. C., 2012, Liver and cadmium toxicity. *J Drug Metab Toxicol S*, 5(001). DOI: 10.4172/2157-7609.S5-001
- Asashima, M., Malacinski, G. M. y Smith, S. C., 1989, Surgical manipulation of embryos, pp 255- 263, *Developmental biology of the axolotl* (J. B. Armstrong and G. M. Malacinski, eds.). Oxford Univ. Press, New York
- Aschoff, J., 1967, Adaptive cycles: Their significance for defining environmental hazards. *Inter Jour of Biome*, 11, 255-278.
- Aschoff, J., 1984, Circadian timing, *Ann. NY Acad., Sci.* 423, 442–468.
- Barnard, A. R., Hattar, S., Hankins, M. W. y Lucas, R. J., 2006, Melanopsin regulates visual processing in the mouse retina, *Curr. Biol.* 16, 389–395. DOI: 10.1016/j.cub.2005.12.045
- Baker, M. A., Cerniglia, G. J. y Zaman A., 1990, Microtiter Plate Assay for the Measurement of Glutathione and Glutathione Disulfide in Large Numbers of Biological Samples, *Anal. Biochem.* , 190, 360-365.

- Balkema, G. W., 1988, Elevated dark-adapted thresholds in albino rodents, *Invest Ophthalmol Vis Sci*;29:544–549. PMID: 3356512.
- Balkema, G. W., y Drager, U. C., 1991, Impaired visual thresholds in hypopigmented animals, *Vis Neurosci.*;6:577–585. DOI: 10.1017/s095252380000256x.
- Balkema, G. W., Cusick, K., y Nguyen, T. H., 2001, Diurnal variation in synaptic ribbon length and visual threshold, *Vis. Neurosci.*;18:789–797. DOI: 10.1017/s0952523801185123
- Baydas, G., Gursu, M., Yilmaz, S., Canpolat, S., Yasar, A., Cikim, G. y Canatan, H., 2002, Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. *Neurosci Lett*, 323(3), pp.195-198. DOI: 10.1016/s0304-3940(02)00144-1.
- Beatty, S., Koh, H. H., Phil, M., Henson, D., y Boulton, M., 2000, The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration, *Surv Ophthalmol*, 45(2), 115-134. DOI: 10.1016/s0039-6257(00)00140-5.
- Beaver, L. M., Klichko, V. I., Chow, E. S., Kotwica-Rolinska, J., Williamson, M., Orr, W. C., Radyuk, S. N. y Giebultowicz, J. M., 2012, Circadian regulation of glutathione levels and biosynthesis in *Drosophila melanogaster*, *PLoS One.*;7(11):e50454. doi: 10.1371/journal.pone.0050454.
- Belanger, M, Allaman, I. y Magistretti P. J., 2011, Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cel.l Metab.* 14: 724–738. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.08.016.
- Bertolesi GE, Debnath N, Malik HR, Man LLH y McFarlane S., 2022, Type II Opsins in the Eye, the Pineal Complex and the Skin of *Xenopus laevis*: Using Changes in Skin Pigmentation as a Readout of Visual and Circadian Activity. *Front. Neuroanat.* 15:784478. DOI: 10.3389/fnana.2021.784478
- Bertolucci C. y A. Foà. 2004, Extraocular reception and circadian entrainment in nonmammalian vertebrates. *Chronobiology International.* 21 (4-5): 501-519. DOI: 10.1081/cbi-120039813.
- Besharse J.C, e Iuvone P.M., 1983, Circadian clock in *Xenopus* eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase. *Nature* 305:133–135. DOI: <https://doi.org/10.1038/305133a0>.
- Birch, D., y Jacobs, G. H., 1979, Spatial contrast sensitivity in albino and pigmented rats, *Vis. Res.* 19:933–937. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(79\)90029-4](https://doi.org/10.1016/0042-6989(79)90029-4)
- Birden, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. y Kalayci O., 2012, Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Org. Jour.*, 9-19, DOI: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.

Boelsterli, A, 2007, Mechanistic toxicology, 2a Ed, CRC Press. USA. 399 p. DOI: <https://doi.org/10.1201/9780367806293>.

Bothwell, M. Y. and Gillette, M. U., 2018, Circadian redox rhythms in the regulation of neuronal excitability, *Free Rad. Biol. and Med.*, 119, 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.025>.

Boulton, M., Rózanowska, M., Rózanowski, B., 2001, Retinal photodamage, *J Photochem Photobiol B.*, 64: 141-161, DOI: 10.1016/s1011-1344(01)00227-5. PMID: 11744401.

Boveris, A., Chance, B., 1973, The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen, *Biochem Jour.*134(3):707-16, DOI: 10.1042/bj1340707.

Cahill, G. M. and Besharse, J. C.,1991, Resetting the circadian clock in cultured *Xenopus* eyecups: regulation of retinal melatonin rhythms by light and D2 dopamine receptors, *J. Neurosci.*11:2959–2971. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.11-10-02959.1991

Cahill, G. M. and Besharse, J. C., 1995, Circadian rhythmicity in vertebrate retinas: Regulation by a photoreceptor oscillator. *Prog. in Retinal and Eye Res.*, Vol. 14, Issue 1 Pages 267-291. DOI: [https://doi.org/10.1016/1350-9462\(94\)00001-Y](https://doi.org/10.1016/1350-9462(94)00001-Y).

Cajaraville, M. P., Hauser, L., Carvalho, C., Hylland K., Olabarrieta, I., Lawrence, A. J., Lowe, D. y Goksøyr, A., 2003, Genetic Damage and the molecular/cellular response to pollution. *Environ. Eff. of poll. on fish Mol. Environ. Res.* (eds A. Lawrence and K. Hemingway). DOI: 10.1002/9780470999691.ch2

Cameron, M. A., Barnard, A. R. and Lucas, R. J., 2008, The electroretinogram as a method for studying circadian rhythms in the mammalian retina, *J. Genet.* 87, 459–466, DOI: <https://doi.org/10.1007/s12041-008-0068-5>

Canadian Council on Animal Care, 2021, CCAC guidelines: Amphibians, Ottawa En: CCAC https://ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/CCAC_Guidelines-Amphibians.pdf

Carrión, C., Ponce-de León, C., Cram, S., Sommer, I., Hernández, M. y Vanegas, C., 2012, Uso potencial del lirio de agua (*Eichhornia crassipes*) en Xochimilco para la fitorremediación de metales, *Agrociencia*, 46(6), 609-620 http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952012000600007&lng=es&tlng=es.

Chang, J. Y., Shi, L., Ko, M. L. y Ko, G. Y., 2018, Circadian Regulation of Mitochondrial Dynamics in Retinal Photoreceptors, *J. Biol. Rhythms.* 33(2):151-165, DOI: 10.1177/0748730418762152.

- Chen, Y., Mehta, G., Vasiliou, V., 2009, Antioxidant defenses in the ocular surface, *The Ocul. Surf.* 7(4):176-185. DOI: 10.1016/s1542-0124(12)70185-4
- Chernoff, E. A. G. y Stocum, D. L., 1995, Developmental aspects of spinal cord and limb regeneration, *Develop., Growth & Diff.*, 37: 133-147. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1440-169X.1995.t01-1-00002.x>
- Chiba, A., Hattori, A. y Iigo, M., 2005, Daily and circadian variations of the pineal and ocular melatonin contents and their contributions to the circulating melatonin in the Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster*, *Zoolog. Sci.* 22(1):65-70. DOI: 10.2108/zsj.22.65.
- Chiba, A., Kikuchi, M. y Aoki, K., 1993, The effects of pinealectomy and blinding on the circadian locomotor activity rhythm in the Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster*. *J Comp Physiol A* 172: 683–691. DOI: 10.1007/BF00195394
- Christin, M. S., Menard, L., Gendron, A. D., Ruby, S., Cyr, D., Marcogliese, D. J., Rollins-Smith L. y Fournier, M., 2004, Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aqua tox*, 67(1), 33-43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.007>
- Circu, L. M. y Aw, T. M., 2010, Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. *Free Rad. Biol. and Med.*, 48: 749-762. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022
- Contreras, V., Martínez-Meyer, E., Valiente, E. y Zambrano, L., 2009, Recent decline and potential distribution in the last remnant area of the microendemic Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Biolog. Conserv.* 142: 2881– 2885 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2009.07.008>
- Cooke, A. S., 1970, The effect of p, p-DDT on tadpoles of the common frog (*Rana temporaria*). *Environ Pollut*, 1, 57/71. DOI: [https://doi.org/10.1016/0013-9327\(70\)90006-6](https://doi.org/10.1016/0013-9327(70)90006-6)
- Cooke, A. S., 1972, The effect of DDT, dieldrin and 1,4-D on amphibian spawn and tadpoles, *Environ Pollut*, 3, 51/68. DOI: [https://doi.org/10.1016/0013-9327\(72\)90017-1](https://doi.org/10.1016/0013-9327(72)90017-1)
- Coyle, J. y Puttfarcken, P., 1993, Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, 262(5134), 689–695. DOI: 10.1126/science.7901908.
- Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T. *et al.* ,2010, Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals* 23, 927–940, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9329-x>

- Damiola F., N. Le Minh, N. Preitner, B. Kornmann, F. Fleury-Olela y U. Schibler. 2000, Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Gen Dev.* 14 (23): 2950-2961. DOI: 10.1101/gad.183500
- Dmitriev, A. V., y Mangel, S. C., 2004, Retinal pH reflects retinal energy metabolism in the day and night. *Jor Neuro*, 91(6), 2404-2412. DOI: <https://doi.org/10.1152/jn.00881.2003>
- De La Paz, M. y Anderson, R.E., 1992, Region and age-dependent variation in susceptibility of the human retina to lipid peroxidation, *Inv. Ophthalmol. Vis.Sci.*33:3497 – 3499. PMID: 1464495.
- Demple, B., 1991, Regulation of bacterial oxidative stress genes, *Ann. Rev. of gen.*,25(1), 315-337. DOI: 10.1146/annurev.ge.25.120191.001531
- Demple, B. y Amábile-Cuevas, C. F., 1991, Redox redux: the control of oxidative stress responses, *Cell*,67(5), 837-839. DOI 10.1016/0092-8674(91)90355-3
- Dentchev, T., Yao, Y., Praticó, D. y Dunaief, J. L., 2007, Isoprostane F_{2α}-VI, a new marker of oxidative stress, increases following light damage to the mouse retina. *Mol.Vis.* 13: 190-195. PMID: 17327824; PMCID: PMC2610371.
- Díaz-Muñoz, M, Hernández-Muñoz, R, Suárez, J y Chagoya de Sánchez, V.,1985, Day-night cycle of lipid peroxidation in rat cerebral cortex and their relationship to the glutathione cycle and superoxide dismutase activity, *Neuroscience*. 16(4):859-63. DOI: 10.1016/0306-4522(85)90100-9.
- Dolmen, D., 1976, Diel rhythm of *Triturus vulgaris*, *Norwegian Jour. of Zool.*, 24, 234. DOI: 10.1016/S0003-3472(85)80081-6
- Dringen, R., 2000, Metabolism and functions of glutathione in brain, *Prog. in neurobio.*, 62(6), 649-671. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01597.x
- Dunlap, P. J. C., Loros, J. J. y Decoursey, J. P., 2004, *Chronobiology: Biological Timekeeping*, EDS. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. 382 p., 278 illustrations.
- Fanjul-Moles, M. L., Duran-Lizárraga, M. E., Gonsebatt, M. E. y Prieto, J., 2003, The effect of photoperiod and light irradiance on the antioxidant circadian system of two species of crayfish from different latitudes: *Procambarus clarkii* and *P. Digueti*, *Photochem. and Photobio.*, 77(2): 210-218. DOI: 10.1562/0031-8655(2003)077<0210:teopal>2.0.co;2.
- Fanjul-Moles, M. L., Prieto-Sagredo, J. A., López, D. S., Bartolo-Orozco, R. y Cruz-Rosas, H., 2008 Crayfish *Procambarus clarkii* retina and nervous system exhibit

- antioxidant circadian rhythms coupled with metabolic and luminous daily cycles. *Photochem. and Photobio.*, 85:78-87. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2008.00399.x.
- Fan, X., Monnier, V. y Whitson, J., 2017, Lens glutathione homeostasis: Discrepancies and gaps in knowledge standing in the way of novel therapeutic approaches. *Exp Eye Res*, 156, pp.103-111. DOI: 10.1016/j.exer.2016.06.018
- Feeney-Burns, L., 1980, The pigments of the retinal pigment epithelium, *Curr Top Eye Res.*;2:119-78. PMID: 6807609.
- Fleming, M. D., Benca, R. M. y Behan, M., 2006, Retinal projections to subcortical visual system in congenic albino and pigmented rats, *Neuroscience*. 143(3):895-904. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.08.016
- Fliesler, A. y Anderson, R., 1983, Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog. in Lipid Res.*, 22(2), pp.79-131. DOI: 10.1016/0163-7827(83)90004-8.
- Fordham CL, Tessari JD, Ramsdell HS, y Keefe TJ., 2001, Effects of malathion on survival, growth, development, and equilibrium posture of bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*). *Environ Toxicol Chem.* 20(1):179-84. DOI:10.1897/1551-5028(2001)020<0179:eomosg>2.0.co;2.
- Franco, R. y Vargas, M. R., 2018, Redox Biology in Neurological Function, Dysfunction, and Aging, *Antioxidants & Redox Signaling*, 28(18), 1583-1586. DOI: 10.1089/ars.2018.7509
- Gayosso-Morales, M. A., Nandini S, Martínez-Jerónimo, F. y Sarma, S. S., 2017, Effect of organic and inorganic turbidity on the zooplankton community structure of a shallow waterbody in Central Mexico (Lake Xochimilco, Mexico). *Jour of Envi Biol.* 38. 1183-1196. DOI: 10.22438/jeb/38/6(SI)/03.
- Gillette, M. U. y Wang, T. A., 2014, Brain Circadian Oscillators and Redox Regulation in Mammals, *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(18), 2955-2965. DOI: 10.1089/ars.2013.5598
- Glickman, R., Gallas, J. M., Jacques, S. L., Rockwell, B. A. y Sardar, D. K., 2000, The physical and photochemical properties of ocular melanin, Internet presentation for Saratov fall confer-ence; 3–6. DOI:https://doi.org/10.1117/12.431511
- Grant, S., Waller, W., Bhalla, A. y Kennard, C., 2003, Normal Chiasmatic Routing of Uncrossed Projections from the Ventrotemporal Retina in Albino *Xenopus Frogs*, *The Jour. of Comp. Neurolog.* 458:425–439. DOI: 10.1002/cne.10598
- Green, C. y Besharse, J., 2004, Retinal Circadian Clocks and Control of Retinal Physiology, *Jour. of Biolog. Rhythms*, 19(2), pp.91-102. DOI: 10.1177/0748730404263002

- Green, D. G, Herreros de Tejada, P. y Glover, M.J., 1994, Electrophysiological estimates of visual sensitivity in albino and pigmented mice. *Vis Neurosci.* doi: 10.1017/s0952523800003874.
- Griffith, O. W., 1980, Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductasa and 2-Vinylpyridine, *Anal. Biochem.*, 106, 207-212. DOI: 10.1016/0003-2697(80)90139-6
- Gruart, A., Delgado, J. M., Escobar, C. y Aguilar-Roblero, R., 2002, *Los relojes que gobiernan la vida.* México:FCE, SEP, CONACyT. 197pp. ISBN: 9789681666767
- Grunsven R. van, Creemers, R., Joosten, J, Donners, M. y Veenendal, E.,2016, Behavior of migrating toads under artificial lights differs from other phases of their light cycle, *Amphibia-Reptilia.* 38 (1). DOI: 10.1163/15685381-00003081
- Hakkari, O. A. H., Acar, N., Savier, E., Spinnhirny, P., Bennis, M., Felder-Schmittbuhl, M. P., y Hicks, D., 2016, Rev-Erb modulates retinal visual processing and behavioral responses to light. *FASEB Journal*, 30(11), 3690-3701.DOI: 10.1096/fj.201600414R.
- Handelman, G. J. y Dratz, E. A., 1986, The Role of Antioxidants in the Retina and Retinal Pigment Epithelium and the Nature of Prooxidant-Induced Damage. *Adv. in Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 2, pp. 1-89. DOI:10.1016/S8755-9668(86)80024-2
- Hardeland, R., Coto-Montes, A. y Poeggeler, A., 2003, Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol. Int.* 20, 921–962. DOI: 10.1081/cbi-120025245
- Hielscher, E. S. M., Summers, C. G. and Holleschau, A. M., 2009, Photosensitivity in albinism. *Jour. of Ame. As. for Ped. Ophthalmol. and Strabismus*, 13(1). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaapos.2008.12.040>
- Hill, R., Anderson, M. y Wyse, G., 2012, *Animal Physiology*, Sunderland: Sinauer Associates.
- Hille, B, 2001, *Ion Channels of Excitable Membranes* (3rd edn), Sunderland, MA: Sinauer Associates. ISBN: 9780878933211
- Hinostroza E, Serrano-Martínez E, 2013, Efecto anestésico del metasulfonato de tricaina en paiches (*Arapaima gigas*) juveniles. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.* 24(4):451-458. Recuperado en 10 de septiembre de 2023, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172013000400006&lng=es&tlng=es.

- Humphrey, R. R., 1967, Albino Axolotls from an Albino Tiger Salamander through Hybridization, *Jour. of Her.* 58(3), 95–101. DOI:10.1093/oxfordjournals.jhered.a10757210.1093/oxfordjournals.jhered.a107572
- Hut, R.A., Kronfeld-Schor N., van der Vinne, V., De la Iglesia, H., 2012, In search of a temporal niche: environmental factors, *Prog. Brain Res*, 199 281-304. DOI: 10.1016/B978-0-444-59427-3.00017-4.
- Hu, D. N., 2007, Photobiology of Ocular Melanocytes and Melanoma, *Photochem. and Photobio.*, 81(3), 506-509. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2005.tb00217.x>
- Isaacs, J. T., Binkley, F., 1977, Cyclic AMP-dependent control of the rat hepatic glutathione disulfide-sulfhydryl ratio. *Biochim, Biophys. Acta*: 498:29–3. DOI: 10.1016/0304-4165(77)90084-8
- Ito, S., 2003, The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melano- genesis, *Pigment Cell Res* 16: 230–236. DOI: 10.1034/j.1600-0749.2003.00037.x
- Kandori, H., Shichida, Y. y Yoshizawa, T., 2001, Photoisomerization in Rhodopsinm, *Biochemistry (Moscow)*66, 1197–1209. DOI: 10.1023/a:1013123016803.
- Kaplan, H. M. y Overpeck, J. G., 1964, Toxicity of Halogenated Hydrocarbon Insecticides for the Frog, *Rana pipiens*, *Herpetologica*, 20(3), 163–169. <http://www.jstor.org/stable/3891038>
- Kohen, R. y Nyska, A., 2002, Oxidation of Biological Systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods of their quantification, *Toxicol. Pathol.*, 30(6): 620-50. DOI: 10.1080/01926230290166724
- Konishi, H., Ohta, M., y Homma, K., 1985, Important role of the eye controlling the locomotor rhythm in quail. *Jour of Interdis Cycle Res*, 16, 217-226. DOI: <https://doi.org/10.1080/09291018509359888>
- Ko GY, Shi L, y Ko ML., 2009, Circadian regulation of ion channels and their functions. *J Neurochem.* 110(4):1150-69. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06223.x.
- Kosower, N. S. y Kosower, E. M., 1978, The glutathione status of cells, *Int. rev. Cytol.* 54, 109-160. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60166-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60166-7)
- Koukkari W. L. and R. B. Sothorn, 2006, *Introducing biological rhythms: A primer on the temporal organization of life, with implications for health, society, reproduction, and the natural environment.* Springer Science. New York. pp. 655 DOI:10.1007/978-1-4020-4701-5

- Lauber, J. K. y Vriend, J., 1989, Melatonin Reduction by Lithium and Albinism in Quail and Hamsters, *Gen. and comparative endocrinology*, 76: 414-420. DOI: 10.1016/0016-6480(89)90137-8
- LaVai, M. M., 1980, Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* ;19: 407–411.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M., 2007, *Lehninger: principios de bioquímica*, Ediciones Pirámide. ISBN: 9788428216678
- Li, X. M., Metzger, G., Filipski, E., Boughattas, N., Lemaigre, G., Hecquet, B., Filipski J. y Levi, F., 1997, Pharmacologic modulation of reduced glutathione circadian rhythms with buthionine sulfoximine: relationship with cisplatin toxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 143(2), 281-290. DOI: 10.3109/07420529808998693.
- Limón-Pacheco, J. H. y Gonsebatt, M. E., 2010, The glutathione system and its regulation by neurohormone melatonin in the central nervous system, *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 10(4):287-297. DOI: 10.2174/187152410793429683
- Lozano, D. C., Hartwick, A. T. y Twa, M. D., 2015, Circadian rhythm of intraocular pressure in the adult rat, *Chronobiol. Int.* ;32:513–523.
- Lushchak, V. I., 2016, Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach, *Fish physiol. and biochem.*, 42, 711-747. DOI. 10.1007/s10695-015-0171-5
- Lushchak, V. I., 2001, Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria, *Biochem. (Moscow)*, 66, 476-489.
- Mackic, J. B, Kannan-, R., Kaplitz, N. y Zlokovic, B. V., 1997, Low de novo glutathione synthesis from circulating sulfur amino acids in the lens epithelium, *Exp. Eye Res.* 64, 615-626.
- Mason JE, Starke RD, Van Kirk JE, 2010, Gamma-glutamyltransferase: A novel cardiovascular risk biomarker. *Prev Cardiol.* 13(1):36-41. doi: 10.1111/j.1751-7141.2009.00054
- Mathis, A., y Vincent, F., 2000, Differential use of visual and chemical cues in predator recognition and threat-sensitive predator-avoidance responses by larval newts (*Notophthalmus viridescens*). *Can J. Zool.* 78(9), 1646-1652. DOI: <https://doi.org/10.1139/z00-090>
- Matthews, H. R., Fain, G. L., Murphy, R. L. y Lamb, T. D., 1990, Light adaptation in cone photoreceptors of the salamander: a role for cytoplasmic calcium, *J. Physiol.* 420:447–46 DOI: 10.1113/jphysiol.1990.sp017922

- Milev, N. B. y Reddy, A. B., 2015, Circadian redox oscillations and metabolism, *Trends in Endoc. & Metabol.*, 26(8), 430-437. DOI: 10.1016/j.tem.2015.05.012
- Mitchell, M. A., 2009, Anesthetic considerations for amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18(1), 40-49. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2008.11.006>
- Mittag, T. W., Bayer, A. U. y La Vail, M. M., 1999, Light-induced retinal damage in mice cyingarr a mutated SOD I gene, *Exp. eye res*, 69(6), 677-683. DOI: 10.1006/exer.1999.0748
- Moore-Ede, M.C., Sulzman, M. F. y Fuller, A. C., 1984, A physiological system measuring time, *The Clock that time us: Physiol. of the circadian timing sys.* Cambridge: Harvard University Press. England. pp: 1-29. ISBN 0674135806, 9780674135802
- Mortola, J. y Lanthier, C., 2004, Scaling the amplitudes of the circadian pattern of resting oxygen consumption, body temperature and heart rate in mammals, *Comp. Biochem. and Physiol. Part A: Mol. & Integ. Physiol.*, 139(1), pp.83-95. DOI: 10.1016/j.cbpb.2004.07.007
- Muneoka, K., Holler-Dinsmore, G. y Bryant, S., 1986, Regeneration from discontinuous circumferences in axolotl limbs, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 217A:61-5. PMID: 3749160. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.93.1.51>
- Murphy, M. P., 2009, How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem J* 417: 1–13. DOI: 10.1042/BJ20081386
- Nan, H., Changyue, Y., Jiabin, J., Xinmiao, Z., Yingying, Z., Hua, W. y Yingdong, L., 2022, Impact of photoperiods on the specific activities of immune and antioxidant enzymes in different tissues of Dybowski's frog (*Rana dybowskii*), *Biological Rhythm Res.*, 53:11,1790-1799, DOI: 10.1080/09291016.2022.2043588
- Navarro, J. A., Ramírez, R. A., y Villagrán, C., 2012, *Manual de Procedimientos recomendables para la investigación con animales.* [internet]. México: SAMSARA.
- Navigatore-Fonzo, L. S., Delgado, S. M., Gimenez, M. S. y Anzulovich, A. C., 2014, Daily rhythms of catalase and glutathione peroxidase expression and activity are endogenously driven in the hippocampus and are modified by a vitamin A-free diet, *Nutr. Neurosci.* 17(1):21-30. DOI: 10.1179/1476830513Y.0000000062. Epub 2013 Nov 26
- Neuschwander-Tetri, B. A. y Rozin, T., 1996, Diurnal variability of cysteine and glutathione content in the pancreas and liver of the mouse, *Comp. Biochem. Physiol.* 114B:91–95. DOI: 10.1016/0305-0491(96)83706-0
- Noell, W. K., 1980, Possible mechanisms of photoreceptor damage by light in mammalian eyes, *Vis. Res.*, 20 pp. 1163-1171. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(80\)90055-3](https://doi.org/10.1016/0042-6989(80)90055-3)

NOM-033-SAG/ZOO-2014. Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres.pdf. Revisado el 10-09-23 en <https://www.gob.mx/profepa/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-033-sag-zoo-2014-metodos-para-dar-muerte-a-los-animales-domesticos-y-silvestres>

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. pdf. Revisado el 10-09-23 en https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf

Nye, H. L. D., Cameron, J. A., Chernoff, E. A. G. y Stocum, D. L., 2003, Regeneration of the urodele limb: A review, *Dev. Dyn.*, 226: 280-294. DOI <https://doi.org/10.1002/dvdy.10236>

Nye, H. L., Cameron, J. A., Chernoff, E. A. y Stocum, D. L., 2003, Extending the table of stages of normal development of the axolotl: limb development, *Dev Dyn.*, 555-60. DOI: 10.1002/dvdy.10237. PMID: 12619140.

Oishi, T., Nagai, K., Harada, Y., Naruse, M., Ohtani, M., Kaurano, E. y Tamotsu, S., 2004, Circadian rhythms in amphibians and reptiles: ecological implications, *Biol. Rhythm Res.*, 35(1-2): 105-120. DOI: <https://doi.org/10.1080/09291010412331313278>

O'Neill, J. S. y Feeney, K. A., 2014, Circadian Redox and Metabolic Oscillations in Mammalian Systems, *Antiox. & Redox Sign.*, 20(18), 2966-2981. DOI: 10.1089/ars.2013.5582

Organisciak, D.T. y Winkler, B.S., 1994, Retinal light damage: practical and theoretical considerations. *Prog. Retin. Eye Res.* 13, 1e29. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2009.11.004

Ortiz-Santaliestra, M. E., Fernández-Benéitez, M. J., Marco, A., & Lizana, M. , 2010, Influence of ammonium nitrate on larval anti-predatory responses of two amphibian species. *Aquatic Toxicology*, 99(2), 198-204. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.020>

Pablos, M. I., Reiter, R. J., Ortiz, G. G., Guerrero, J. M, Agapito, M. T. , Chuang, J. and Sewerynek, E., 1998. Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem. Int.* 32: 69-75. DOI: 10.1016/s0197-0186(97)00043-0

Park, D., McGuire, J. M., Majchrzak, A. L., Ziobro, J. M., & Eisthen, H. L., 2004, Discrimination of conspecific sex and reproductive condition using chemical cues in axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *J Comp Physiology A*, 190, 415-427. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00359-004-0510-y>

- Peek, C. B., Ramsey, K. M., Levine, D. C., Marcheiva, B., Perelis, M. y Bass, J., 2015, Circadian Regulation of Cellular Physiology, *Methods in Enzymol.*, 165-184. DOI: 10.1016/bs.mie.2014.10.006
- Pierce, M. E. and Besharse, J. C., 1985, Circadian regulation of retinomotor movements, I. Interaction of melatonin and dopamine in the control of cone length, *J Gen Physiol*, 86(5), 671-689. <https://doi.org/10.1085/jgp.86.5.671>
- Pittendrigh, C. S., 1981, General perspective, In: Aschoff J. 1984, Biological clock. Handbook of behavioral neurobiology, *Plenum Press*. New York 4:56-79. ISBN: 978-1-4613-5438-3
- Possidente, B, Hegmann, J. P., Carlson, L. y Elder, B., 1982, Pigment mutations associated with altered circadian rhythms in mice, *Physiol. Behav.* 28:389–392. DOI: 10.1016/0031-9384(82)90129-9
- Prota, G., 1992, *Melanins and Melanogenesis*, New York: Academic. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2009-0-03380-7>
- Prota, G. 1995, The chemistry of melanins and melanogenesis, *Fortsch Chem. Organ. Natur.*, 64: 93–148. DOI: 10.1007/978-3-7091-9337-2_2
- Prusky, G. T., Harker, K. T., Douglas, R. M. y Wishaw, I. Q., 2002, Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains, *Behav. Brain Res.* 136:339–348. DOI: 10.1016/s0166-4328(02)00126-2
- Reddy, V. N., 1990, Glutathione and its function in the lens—an overview. *Exp. eye res.*, 50(6), 771-778.
- Rhoades, R. W. and Henry, K. R., 1977, Effects of single albino gene substitutions on the performance of mice in a compound avoidance-discrimination task, *Physiol. Behav.*, 19:87–92. DOI: 10.1016/0031-9384(77)90164-0
- Riley, P.A., 1997, Melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29(11):1235-1239.
- Roberts, J., 2001, Ocular phototoxicity, *Jour. of Photochem. and Photobiol. B: Biology*, 64(2-3), pp.136-143. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00013-7](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00013-7)
- Robles, M. C., García-Basilio, C. E. y Vanegas-Pérez, R. C., 2009, Soluciones de mantenimiento de juveniles del ajolote *Ambystoma mexicanum* (Amphibia: Caudata. *Hidrobiológica*. 19 (3):205-210. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972009000300003&lng=es&tlng=en.

- Robles-Mendoza, C., Zuñiga-Lagunes, S., Ponce de León-Hill, C. A., Hernández-Soto, J. and Vanegas-Perez, C., 2011, Esterases activity in the axolotl *Ambystoma mexicanum* exposed to chlorpyrifos and its implication in locomotion activity, *Aquatic Toxicology*, 105: 728-34. DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.09.001
- Rudic R. D., P. McNamara, A-M Curtis, R. C. Boston, S. Panda, J. B. Hogenesch y G. A. FitzGerald, 2004, BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol.* 2 (11): e377. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020377>
- Ruggiero, L. y Silver, R., 2010, Circadian and Circannual rhythms and hormones. Elsevier Ltd. *Encyclopedia of Animal Behavior*, Academic Press. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045337-8.00259-X>.
- Sarna, T., 1992, New trends in photobiology: properties and function of the ocular melanin—a photobiophysical view, *Jour. of Photochem. and Photobio. B: Biology*, 12(3), 215-258. DOI: 10.1016/1011-1344(92)85027-R.
- Sarna T. y Swartz H.M., Interaction of melanin with oxygen (and related species), 1993, in: G. Scott (Ed.), *Atmospheric Oxidation and fluorescence spectroscopy study*, *Photochem. Photobiol.* 54 Antioxidants, Vol. III, Elsevier, Amsterdam, pp. 129–169. ISBN:0-444-89617-1
- Schreckenber, G. M. y Jacobson, A. G., 1975, Normal stages of development of the axolotl, *Ambystoma mexicanum* *Developmental Biology*. 400: 391–399. DOI: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90343-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90343-7)
- Sealy, R. C., Felix, C. C., Hyde, J. S. y Swartz, H. M., 1980, Structure and reactivity of melanins: influence of free radicals and metal ions, In *Free Radicals in Biology* (Edited by Pryor W. A.), Vol. 4, pp. 209-259. Academic Press, New York. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-566504-9.50014-3>
- Shinn, C., Marco, A., y Serrano, L., 2008, Inter-and intra-specific variation on sensitivity of larval amphibians to nitrite. *Chem*, 71(3), 507-514. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.09.054>
- Skelly, D. K., 1994, Activity level and the susceptibility of anuran larvae to predation, *Animal Behav.* 47: 465–468. <https://doi.org/10.1006/anbe.1994.106>
- Simonian, A. N. y Coyle, J. T., 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36, 83–106. DOI: 10.1146/annurev.pa.36.040196.000503
- Sivak, B. y Sivak, J., 2000, Vertebrate eye development and refractive function: an overview, *Results and Problems in Cell Diff.*, 31, 1–14. DOI: 10.1007/978-3-540-46826-4_1

Sollars, P. J. y Pickard, G. E., 2015, The Neurobiology of Circadian Rhythms, Psych. Clinics of North America, 38(4), 645-665. DOI: 10.1016/j.psc.2015.07.003.

Squire L., Berg D., Bloom F., du Lac S., Ghosh A., Spitzer N. 2013. Fundamental neuroscience. Chapter 12: Brain energy metabolism. Academic Press. 1127 p. ISBN: 978-0-12-374019-9

Strettoi, E. y Parisi, V., 2014, Fundamental Retinal Circuitry for Circadian Rhythms. Tosini, G., Iuvone, P., McMahon, D., Collin, S. (eds) The Retina and Circadian Rhythms. Springer Series in Vision Research, vol 1. Springer, New York, NY. DOI 10.1007/978-1-4614-9613-7_2,

Stokkan K. A., S. Yamazaki, H. Tei, Y. Sakaki y M. Menaker, 2001, Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. Science. 291 (5503): 490-3 DOI: 10.1126/science.291.5503.490.

Storch, K. F., Paz, C., Signorovitch, J., Raviola, E., Pawlyk, B., Li, T. y Weitz, C. J., 2007, Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: importance for retinal processing of visual information, Cell, 130(4), 730-741. DOI:https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.045

Storz, G. and Imlay, J. A., 1999, Oxidative stress, Current opinion in microbiology,2(2), 188-194. DOI: 10.1016/S1369-5274(99)80033-2

Summers, C. G., 2009, Albinism: Classification, Clinical Characteristics, and Recent Findings, Optometry and Vision Science, 86(6), 659-662. DOI: 10.1097/0px.0b013e3181a5254c

The Pennsylvania State University (s.f), Amphibians, Fish, Reptiles Euthanasia Methods. En: research.psu.edu/newanimal/euthanasia/amphibians-fish-reptiles#:~:text=Benzocaine%20hydrochloride,following%20cessation%20of%20respiratory%20movement.

Tsuchiya, S., Buhr, E. D., Higashide, T., Sugiyama, K. y Van Gelder, R. N., 2017, Light entrainment of the murine intraocular pressure circadian rhythm utilizes non-local mechanisms, PLoS One.12:e0184790.

Turrens, J. F., 1997, Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. Biosci. Rep. 17. DOI: https://doi.org/10.1023/A:1027374931887

Underwood, H., 2001, Circadian organization in nonmammalian vertebrates, Takahashi, J. S., Turek, F. W., Moore, R. Y., eds., Handbook of Neurobiology: Circadian clocks 12. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 111-140. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1201-1_6

- Underwood, H., y Siopes, T., 1984, Circadian organization in Japanese quail. *Jour Exp Zoo*, 232, 557-566. DOI:10.1002/jez.1402320323
- Underwood, H., y Siopes, T., 1984, Circadian organization in Japanese quail. *Jour of Exp Zoo*, 232, 557-566. doi: 10.1002/jez.1402320323.
- Vadillo-González, S., 2015, Efecto subletal del cadmio en el ajolote *Ambystoma mexicanum*: ritmicidad diaria del metabolismo aerobio y respuestas al estrés oxidante, Tesis que para obtener el título de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. TESIUNAM.
- Vanegas-Pérez, C., Zúñiga-Lagunes, S., Ponce de León-Hill, C., Cram, S., Hernández-Quiroz, M. y Rosas-Pérez, I., 2015, Manual de Procedimientos para la evaluación de efectos toxicológicos: métodos bioquímicos para la evaluación de la exposición y efecto de contaminantes. Serie 1. PAPIME–DGAPA (PE206210). ISBN No. 978-607-02-6391-0. Las Prensas de Ciencias, UNAM.
- Valdez Caro, J. M., 2019, Ritmicidad circadiana de la actividad locomotora en el ajolote *Ambystoma mexicanum*: sincronización a la luz y al alimento Tesis para obtener el título de Licenciado en Biología, UNAM, TESIUNAM.
- Vargas A. M., Geish, M., Everton, F., Pinto, B., Vaz Batista, D., de Jesus, G., Maia, L., y Allodi, S., 2010, Influence of the dark/light rhythm on the effects of UV radiation in the eyestalk of the crab *Neohelice granulata*, *Comparative Biochem. and physiol.*, Part C. Part C 151 343–350. DOI: 10.1016/j.cbpc.2009.12.011
- Vogiatzis, A.K. and Loubourdis, N.S., 1998, Cadmium accumulation in liver and kidneys and hepatic metallothionein and glutathione levels in *Rana ridibunda*, after exposure to CdCl₂, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 64–68. DOI:10.1007/s002449900286
- Wang, T. A., Yu, Y. V., Govindaiah, G., Ye, X., Artinian, L., Coleman, T. P., Sweedler, J. V., Cox, C. L. y Gillette, M. U., 2012, Circadian Rhythm of redox state regulates excitability in suprachiasmatic nucleus neurons. *Science* 337: 839–842. DOI: 10.1126/science.1222826
- Weiter, J. J., DeLori, F.C., Wing, G.L. y Fitch, K.A., 1986, Retinal pigment epithelium lipofuscin and choroidal melanin in human eyes, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* PMID: 3943941
- Wells K. D, 2007, The ecology and behavior of amphibians. The University of Chicago Press. Chicago. pp. 622. DOI:10.7208/chicago/9780226893334.001.0001
- Werner, E. y Anholt, B., 1993, Ecological consequences of the trade-off between growth and mortality rates mediated by foraging activity, *American Natur.* 142: 242–272. DOI: 10.1086/285537

- Wong-Riley, M., 2010, Energy metabolism of the visual system. *Eye and Brain*. 2: 99-116. DOI: 10.2147/EB.S9078
- Wright, M. L., Francisco, L. L., Scott, J. L., Richardson, S. E., Carr, J. A., King, A. B., Visconti, R. F., 2006, Effects of bilateral and unilateral ophthalmectomy on plasma melatonin in *Rana* tadpoles and froglets under various experimental conditions. *Gen. and comp. endoc.* 147(2), 158-166. DOI: 10.1016/j.ygcen.2005.12.014
- Xie, Z., Ahmad, I. M., Zuo, L., Wang, H., & Li, D. (2022). Hibernation with Rhythmicity in the Retina, Brain, and Plasma but Not in the Liver of Hibernating Giant Spiny Frogs (*Quasipaa spinosa*). *Biology*, 11(5), 722. <https://doi.org/10.3390/biology11050722>
- Xu, Y., Zhang, D., Jin, T., Cai, D. J., Wu, Q., Lu, J., Liu, J. y Klaass, C.D., 2012, Diurnal variation of hepatic antioxidant gene expression in mice, *Plos one*. 7(8): e44237. DOI: 10.1371/journal.pone.0044237
- Yoshikawa T. y T. Oishi, 1998, Extrarretinal photoreception and circadian systems in nonmammalian vertebrates. *Com Biochem and Phys.* 119B (1): 65 – 72. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00290-3](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00290-3)
- Yusifov, E. Y., Kerimova, A. A., Atalay, M. y Kerimov, T. M., 2000, Light exposure induces antioxidant enzyme activities in eye tissues of frogs, *Pathophysiology*, 7(3), 203-207. DOI:10.1016/s0928-4680(00)00051-1
- Zhang, Q., Roche, M., Gheres, K. W., Chaigneau, E., Kedarasetti, R. T., Haselden, W. D., Charpak, S. y Drew, P.J., 2019, Cerebral oxygenation during locomotion is modulated by respiration, *Nat. Commun.*,10(1):5515. DOI: 10.1038/s41467-019-13523-5.
- Zambrano, L., 2004, Informe final del proyecto AS004 Abundancia y estructura poblacional del axolotl (*Ambystoma mexicanum*) en los sistemas dulceacuícolas de Xochimilco y Chalco.México. CONABIO. EN: <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfAS004.pdf>.
- Zambrano, L., Vega, E., Herrera, L. G., Prado, E. y Reynoso, V.H., 2007, A population matrix model and population viability analysis to predict the fate of endangered species in highly managed water systems, *Animal Conservation* 10, 297–303.
- Zar, J. H., 1999, *Biostatistical Analysis*, 4th edition. Prentice Hill. ISBN: 978-0275967406