



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE INYECCIONES DIARIAS DE MELATONINA  
SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RITMO CIRCADIANO DE  
ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ DE LA LAGARTIJA  
*Sceloporus torquatus***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIOLOGA**

P R E S E N T A :

**PAULA VIOLETA VASQUEZ JIMENEZ**

TUTOR

**DR. MANUEL MIRANDA ANAYA**



2007

## **DATOS DEL JURADO**

### 1. Datos del alumno

Vásquez  
Jiménez  
Paula Violeta  
24573065  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
099770079

### 2. Datos del Tutor

Dr.  
Manuel  
Miranda  
Anaya

### 3. Datos Sinodal 1

Dra.  
Pilar  
Durán  
Hernández

### 4. Datos Sinodal 2

Dr.  
León Federico  
Cintra  
Mc Glone

### 5. Datos Sinodal 3

Dr.  
Baltasar  
Barrera  
Mera

### 6. Datos Sinodal 4

M. en C.  
Enrique  
Moreno  
Sáenz

## AGRADECIMIENTOS

A mis papás por darme la vida, a mi padre por enseñarme el amor a la lectura, a mi madre por apoyarme sin cuestionarme en el camino que decidí seguir, en el cual entro a una nueva etapa el día de hoy.

A mis hermanas Alba y Daniela por ser mis amigas, por estar conmigo en todo momento y porque son unas personas maravillosas.

A Jorge Bertini por quererme como a una hija mas e incentivar me a terminar esta licenciatura.

A mi tutor y maestro Manuel Miranda Anaya por su fe en mi, su paciencia y por apoyarme todo el tiempo en este proyecto.

A mis amigos Francisco Sánchez, Antonio Sánchez, Amador Paleo, Andrés Días, Marina López, Claudia Villagrán, Ximena Levil, Arturo Suárez, Javier Naranjo, Alberto Mesa, Adonis Reyes, Paola Porras, por apoyarme y estar conmigo en las buenas y en las malas.

A Alejandro Orozco por su apoyo, por protegerme, tratar de entenderme y sobre todo por quererme.

A mis maestros Carlos Candelaria, Julieta Morado, Shaday Michan, Nely Diego, Enrique Moreno y Manuel Uribe, que me inspiraron e incentivaron a dar siempre mas de mi.

A todos quienes coincidieron conmigo en este camino y me dieron su amistad, sus consejos y su cariño.

## INDICE.

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>1. ¿QUÉ SON LOS RITMOS BIOLÓGICOS?.....</b>	<b>2</b>
<b>2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS RITMOS CIRCADIANOS.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Libre Curso.....</b>	<b>8</b>
<b>2.2 La Sincronización.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3 Enmascaramiento.....</b>	<b>13</b>
<b>2.4 La Compensación de la Temperatura.....</b>	<b>14</b>
<b>3. ORGANIZACIÓN CIRCADIANA EN VERTEBRADOS NO MAMÍFEROS.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Fotorreceptores Circadianos.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2 La Glándula Pineal como fotorreceptor y Oscilador.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3 Efectos de Remoción del Órgano Pineal y de su Transplante.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4 Los ojos como Reloj Circadiano.....</b>	<b>22</b>
<b>3.5 Núcleo Supraquiasmático.....</b>	<b>24</b>
<b>4. LA MELATONINA.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Localización y papel fisiológico de los receptores de Melatonina en el Sistema Circadiano.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Papel de la Melatonina en el Sistema Circadiano de los Vertebrados no mamíferos.....</b>	<b>29</b>
<b>5. BIOLOGÍA DE LA LAGARTIJA <i>Sceloporus torquatus</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1 Taxonomía y Características Morfológicas.....</b>	<b>30</b>
<b>5.2 Hábitat y distribución.....</b>	<b>31</b>
<b>5.3 Ciclo Reproductivo.....</b>	<b>32</b>
<b>6. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>33</b>
<b>7. HIPÓTESIS.....</b>	<b>35</b>
<b>8. OBJETIVOS GENERALES.....</b>	<b>36</b>
<b>8.1 Objetivos Particulares.....</b>	<b>36</b>
<b>9. MATERIAL Y MÉTODO.....</b>	<b>37</b>
<b>9.1 Obtención y Mantenimiento de las lagartijas.....</b>	<b>37</b>
<b>9.2 Análisis de datos.....</b>	<b>39</b>
<b>9.3 Diseño Experimental.....</b>	<b>40</b>

<b>10. RESULTADOS</b> .....	43
<b>11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	54
<b>12. CONCLUSIONES</b> .....	59
<b>13. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	60

## RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el efecto de la melatonina sobre ritmo circadiano de actividad locomotriz de la lagartija *Sceloporus torquatus*. El objetivo de este trabajo fue determinar si la aplicación diaria de inyecciones de melatonina, sincroniza el ritmo circadiano de actividad en oscuridad constante y si el mismo tratamiento restituye el ritmo circadiano durante la arritmia producida por la luz brillante constante. *S. torquatus* es un modelo de investigación que ha facilitado el estudio de la participación de la glándula pineal en distintas propiedades del sistema circadiano de reptiles, por lo que es también un modelo ideal para el objetivo de estudio en el presente trabajo. Los animales fueron colectados en las localidades de San Andrés Tlalcatayac (Estado de México), en el Pedregal de San Ángel y en el Desierto de los Leones (Distrito Federal). Las lagartijas recolectadas se mantuvieron para su habitación en condiciones de laboratorio durante una semana. La actividad locomotriz fue registrada mediante el uso de sensores infrarrojos adaptados a acuarios y los registros de actividad se desarrollaron en oscuridad o luz constante. A las lagartijas se les inyectó diariamente y durante 10 días, 10  $\mu$ l de una solución vehículo, de etanol al 1% en agua. Posteriormente, se le administró una vez al día durante otros 10 días más una solución de vehículo que contenía 3  $\mu$ g de melatonina. La actividad fue analizada en forma de actogramas de doble gráfica y por medio de periodogramas de  $X^2$  y perfil de actividad promedio. La sincronización fue considerada en función al cambio de periodo y a la relación de fase entre la aplicación de la melatonina y el inicio de actividad del animal. Los resultados obtenidos indican que la inyección periódica de melatonina en condiciones de oscuridad constante, cambian el periodo del ritmo de actividad a uno cercano al del ciclo de inyecciones, indicando una posible sincronización; mientras que en arritmia producida por luz constante no se observa que las inyecciones de la melatonina tuvieran un efecto de restauración del ritmo circadiano. Lo anterior sugiere que la arritmia, posiblemente causada por un desacoplamiento interno de los osciladores que regulan el ritmo de actividad locomotriz no es sensible a las dosis de melatonina usadas en el presente trabajo.

## INTRODUCCIÓN

### 1. ¿QUÉ SON LOS RITMOS BIOLÓGICOS?

Un Ritmo Biológico se conoce como la repetición regular de una característica biológica a lo largo del tiempo. Se pueden distinguir dos categorías generales: aquellos ritmos correlacionados con cambios periódicos del planeta (mareas, días, estaciones y años) y los homeostáticos, que no se relacionan con eventos relacionados con los movimientos de rotación y traslación del planeta (por ejemplo la frecuencia cardiaca y los movimientos respiratorios). Los ritmos biológicos generalmente aparecen como una adaptación del organismo a las variaciones cíclicas del ambiente. En condiciones naturales los ritmos biológicos presentan una frecuencia muy cercana a la del estímulo externo con que éstos se relacionan (Gruart *et al*, 2002). Los ritmos biológicos clasificados con base en su frecuencia se dividen en infradianos, cuyo periodo tiene una duración mayor a 24 horas (los ciclos lunares, las migraciones, la reproducción, etc); los ritmos circadianos, con duración cercana a las 24 horas (como el ciclo de sueño-vigilia) y los ritmos ultradianos, que tienen una duración menor a un día (Dunlap *et al*, 2004). El término circadiano (del latín circa = cerca, y diano = día) fue introducido por Franz Halberg en 1959.

El primer experimento conocido relacionado con los ritmos biológicos se realizó en 1729, cuando el astrónomo francés Jean Jaques d'Ortous de Mairan observó un aspecto interesante en el movimiento de las hojas de la gramínea *Mimosa púdica*, la cual abría sus hojas durante el día y las cerraba en la noche.

Al colocar la planta en oscuridad constante, las hojas aún se abrían y cerraban con periodicidad circadiana. Más tarde, en 1758 Henry-Louis Duhamel al no creer que dicha planta pudiera mantener el movimiento de sus hojas alejada del sol decidió repetir el experimento de DeMairan bajo condiciones más rigurosas de oscuridad constante. La planta fue colocada dentro de un armario y cubierta por un tubo de cuero, al observar DeMairan que en ausencia de luz el ciclo de movimiento de las hojas persistía, se dió a la tarea de averiguar si la temperatura podía actuar como un estímulo a éste fenómeno. Repitió el experimento en un invernadero donde la temperatura se mantuvo constantemente alta y el resultado fue en ambos casos el mismo, las hojas se abrían y cerraban rítmicamente. Alfonso De Candolle, un notable botánico suizo, demostró en 1832 que el movimiento de las hojas de *Mimosa* persistía en oscuridad constante, pero al invertir el experimento exponiéndola a la luz constante el ciclo se completaba en 22 horas. Esto sirvió como dato para demostrar que el ritmo no era producto directo de los cambios en el ambiente y que se presentaban con una duración cercana a un día. Pero lo más importante es que demostró que el ciclo de apertura de las hojas se podía sincronizar a estímulos artificiales de luz-oscuridad.

Los trabajos de DeMairan, Duhamel y DeCandolle demostraron, aunque ellos no lo supieran, que el ritmo biológico observado en la planta es endógeno; es decir, es generado por el propio individuo.

En 1928, Erwin Bünning formalizó el estudio de los ritmos biológicos, y propuso que tienen valores adaptativos para los organismos. Sus descubrimientos se acreditan ahora como el inicio de la investigación del fotoperíodo en plantas (revisado en Dunlap *et al*, 2004).

Collin Pittendrigh en la década de 1950 trabajó con insectos, cambiando el ritmo de emergencia de la pupa de *Drosophila sp*, lo cual le sirvió para desarrollar el marco conceptual de los relojes biológicos. Mientras que Jürgen Aschoff, a finales de los años 50, pasó del estudio de los cambios de temperatura del cuerpo humano al ritmo de actividad locomotriz en ratas. Pittendrigh, Aschoff y Franz Halberg, fueron los fundadores de la cronobiología moderna, que se define como la ciencia que estudia las bases de los relojes biológicos que dan lugar a los ritmos circadianos. Cuando dieron a conocer sus trabajos, el interés por medir el tiempo en los organismos se extendió rápidamente en la comunidad científica.

El estudio sistemático de los relojes biológicos de los organismos inicia su auge desde 1960. Los registros de cantos de aves, movimiento de las hojas y movimiento de los pétalos, dejaban ver que los organismos hacían algo más que solo responder a los estímulos del ambiente y se discutía sobre la existencia de un origen exógeno o endógeno de los ritmos biológicos. En 1968 se localizó el marcapasos circadiano en el lóbulo óptico de la cucaracha y del grillo, y fue complementado con el trabajo de Terry Page, quien demostró que la ablación de la región que une el cerebro con el lóbulo óptico producía la pérdida del ritmo de actividad locomotriz y el trasplante de esas estructuras lo restituía. Los trabajos de Moore en 1972 dieron lugar al descubrimiento del marcapasos en mamíferos, reconociendo el Núcleo Supraquiasmático (NQS) del hipotálamo como marcapasos primario. A principios de 1970 Konopka logró clonar el primer gen (*per*) del reloj biológico en *Drosophyla*, mientras que Feldman clonó el primer gen (*frq*) para el reloj de *Neurospora*. (revisado en Dunlap *et al*, 2004).

## **2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS RITMOS CIRCADIANOS.**

Un ritmo circadiano se refiere a la actividad biológica que oscila bajo condiciones ambientales constantes, con un periodo cercano a las 24 horas y sólo ciertos estímulos lo pueden reiniciar. El periodo de los ritmos circadianos raramente es igual a las 24 horas. Consideramos como periodo al tiempo que transcurre entre una fase del ciclo y su recurrencia (figura 1). Cabe señalar que en la cronobiología, el rasgo de periodo es más utilizado que la frecuencia, pese a que la clasificación de los ritmos se haya mantenido con base en ésta última.

En términos generales los ritmos circadianos poseen las siguientes características:

1. Son endógenos, se presentan en oscilación espontánea aún en ausencia de factores externos y están determinados genéticamente.
2. Son ubicuos.
3. Compensan los cambios de la temperatura
4. Pueden ser sincronizados por factores ambientales comunes.

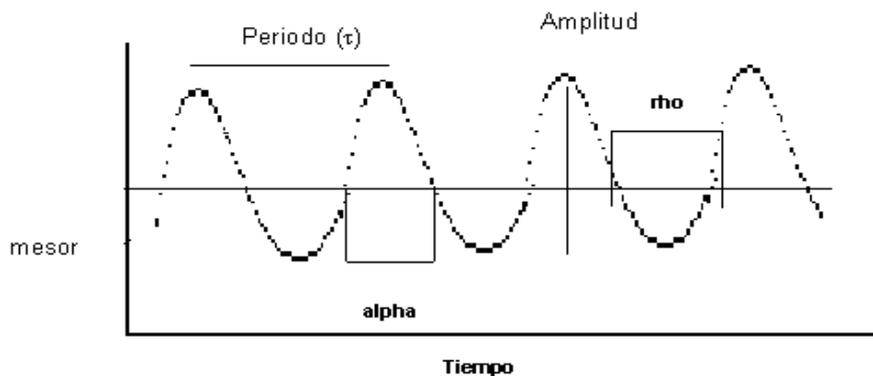
Los términos oscilador, reloj y marcapaso se relacionan a un contador central de tiempo que coordina una gran cantidad de ritmos. Estos tres componentes en definición poseen diferentes connotaciones. Un reloj es un montaje de componentes para medir el tiempo. El marcapaso es una región localizable anatómica y funcionalmente, capaz de mantener su propia oscilación y sincronizar otros elementos osciladores. El oscilador es una serie

de componentes cuya acción e interacción reguladora son suficientes para producir un ritmo pero no necesariamente coordina la oscilación de otros componentes del reloj (Aguilar, 1993).

Un ritmo presenta distintos parámetros que se pueden estudiar mediante una función cosenoidal (Figura 1), tales como:

- **Periodo:** definido como el intervalo de tiempo entre dos acontecimientos idénticos, es decir, la duración de un ciclo completo.
- **Mesor:** valor medio de la variable estudiada calculado a lo largo de un periodo completo.
- **Amplitud:** diferencia entre el mesor y el valor máximo alcanzado por la variable a lo largo del periodo. La amplitud, a veces es considerada también como la altura que existe entre el valle y la cresta de una oscilación.
- **Fase:** valor instantáneo, conocido y predecible de una variable biológica en un momento dado. Siempre se menciona con relación a un evento externo a la oscilación (Golombek, 1997).

La estructura del ritmo se puede estudiar considerando dos etapas: **alpha** ( $\alpha$ ) (activo) y **rho** ( $\rho$ ) reposo. La duración de ( $\alpha$ ) y su actividad, regulación del inicio y término de la actividad, presencia de diversos picos de actividad, la actividad ultradiana, puede variar enormemente en función al tipo de ritmo que se observa.



**Figura 1** Parámetros básicos que componen la función cosenoidal de un ritmo circadiano.

El estudio del reloj circadiano se ha basado principalmente, documentando la presencia o ausencia de actividad en el comportamiento del animal. Los ritmos circadianos que se observan en condiciones constantes de laboratorio, cuyo periodo difiere de 24 horas, en la naturaleza están constantemente sincronizados a 24 horas por la influencia de los sincronizadores ambientales. Los factores ambientales que son capaces de sincronizar a un ritmo circadiano, son también conocidos en cronobiología como los “zeitgebers” vocablo alemán que significa “dador de tiempo” (Golombek, 1997). Debido a que el zeitgeber de mayor influencia son los ciclos de iluminación diaria en los seres vivos expuestos a la luz solar, se considera que en general el sistema circadiano está compuesto por:

- Uno o varios componentes visuales, que son fotorreceptores acoplados a vías que median la sincronización fótica del marcapasos.
- Estructuras marcapasos que generan la señal circadiana.

- Vías eferentes desde los marcapasos a los sistemas efectores que ejecutarán la conducta rítmica.

## **2.1 Libre curso.**

El libre curso (*free running, en inglés*) del ritmo, ocurre cuando el organismo se enfrenta a un ambiente libre de señales temporales, entonces el periodo del ritmo se desvía ligeramente de las 24 h. El valor del periodo depende en gran medida del tipo de organismo que se estudie y las características de las condiciones constantes, así como de las características ambientales que lo influían previamente. Por ejemplo: en mamíferos diurnos en oscuridad constante, el ritmo tiende a durar más de 24 horas y en especies nocturnas menos de 24 horas. Es importante registrar todos estos datos porque la combinación que pueda resultar de ellos nos da una visión característica de cada uno de los organismos. Los periodos circadianos se moderan en condiciones de oscuridad constante, disipándose principalmente en un rango de horario de 22 a más de 26 horas.

## **2.2 La sincronización.**

Normalmente los organismos no viven en condiciones constantes, sino que están expuestos a las condiciones del ambiente que cambian rítmicamente. El ritmo endógeno refleja esta condición mediante su sincronización con el ambiente (*entraining, en inglés*). Se conoce a la sincronización como el ajuste del periodo de ritmicidad biológica al periodo de los ciclos ambientales, manteniendo ambos una relación de fase estable. Es decir que el ritmo

biológico tiene un periodo igual al del zeitgeber del ambiente en que se encuentra el organismo. De acuerdo con Pittendrigh, la sincronización provee a los relojes biológicos de un mecanismo por el cual son capaces de reconocer la hora local, ello les otorga un valor adaptativo (revisado en Aguilar, 1993). Durante la sincronización, los relojes biológicos ajustan su periodo de oscilación ( $\tau$ ) al periodo del ritmo ambiental ( $T$ ) de tal modo que  $\tau = T$ . El sincronizador mejor estudiado son los cambios de luz-oscuridad, o ciclo día y noche, ya que las variaciones de luz son más estables en su periodo y fase, lo que los hace más predecibles. Otros sincronizadores son los ciclos de temperatura, la disponibilidad del alimento y las señales sociales.

Se han propuesto dos modelos para explicar el mecanismo por medio del cual el reloj biológico es sincronizado al ciclo de luz y oscuridad:

a) Modelo continuo

Propone que la velocidad angular o tasa de movimiento del mecanismo del reloj cambia proporcionalmente con la intensidad de luz presente. El organismo recibe información continuamente y ésta ejerce un efecto constante sobre el oscilador. Se generan aceleraciones y desaceleraciones de la velocidad angular del reloj para ajustarlo continuamente al ciclo de luz oscuridad.

La sincronización que se lleva a cabo por medio de la modulación del periodo en libre curso se le conoce como *sincronización paramétrica*, pero el término es matemáticamente inapropiado y se le llama generalmente sincronización continua. Una evidencia de esta modulación es que el ritmo en

libre curso depende de la intensidad de luz, esta observación se resume en lo que se conoce como la regla de Aschoff : al aumentar la intensidad de luz se tiende a acortar el periodo del ritmo en organismos diurnos y a aumentar el periodo del ritmo en animales nocturnos. Otra evidencia sugiere que la luz ejerce una acción constante sobre el reloj durante la sincronización del ciclo luz – oscuridad, y provoca que corra más rápido en luz y sea más lento en oscuridad como sucede en muchos animales nocturnos y opuesto en animales diurnos. La iluminación continua e intensa provoca que el ritmo de actividad locomotriz se pierda y otros ritmos se atenúen hasta desaparecer; esto se ha interpretado como que el reloj u oscilador responsable se detenga o bien que suceda un desacoplamiento del marcapasos y las vías eectoras, así como una desincronización de varios osciladores responsables de coordinar el ritmo manifiesto (Aschoff, 1981).

Una manera de demostrar el modelo continuo, es intentar sincronizar al animal con pulsos de luz, si la sincronización es puramente paramétrica entonces fallará y el animal entrará a libre curso.

#### b) El Modelo Discreto

Fue desarrollado por Pittendrigh en 1966 en sus trabajos con *Drosophila* sp. La premisa básica del modelo dice que un marcapasos circadiano sincronizado está en equilibrio con el ciclo de luz y oscuridad (LO), cuando la luz percibida cada día aporta un cambio de fase suficiente para adelantar o retrasar el periodo y copiar el periodo del ciclo externo de luz. Datos experimentales han demostrado que en algunos roedores, basta un pulso de

luz de un segundo para lograr una sincronización. Las señales sincronizadoras correspondientes en la naturaleza son el amanecer y el crepúsculo. Este modelo se conoce como *modelo discreto* o *no paramétrico*. La simplicidad del modelo recae en sus excelentes propiedades predictivas, que se basan en el periodo en libre curso y en el cambio de fase producido en una hora determinada.

Una sincronización es fuertemente estable cuando la señal de luz genera una respuesta a manera de un cambio de fase con magnitud igual al periodo en libre curso  $\tau$ . Es decir que hay *coordinación absoluta* cuando  $\tau$  – periodo del sincronizador (T) = magnitud del cambio de fase.

Cuando la influencia del sincronizador sobre el marcapasos es débil, no se logra una sincronización completa. Es decir, existe una *coordinación relativa* entre el marcapasos y el zeitgeber, y sucede cuando el cambio de fase evocada por el sincronizador no es lo suficientemente grande como para igualar  $\tau - T$ . Bajo estas condiciones el ritmo parece estar en libre curso, a veces responde al zeitgeber y a veces no.

La sincronización con pulsos de luz en el modelo discreto ha llevado a formular muchas propuestas de los mecanismos de la sincronización. Sin embargo, la mayoría de los organismos viven en condiciones ambientales donde se encuentran sometidos a condiciones constantes de luz durante el día. Excepto las especies nocturnas que normalmente viven bajo tierra o en cavidades y salen a la superficie alrededor del momento en que oscurece. El modelo de sincronización discreta propone que lo relevante del fotoperíodo por sincronización son las transiciones discretas de luz y oscuridad. La hipótesis es que estas transiciones de luz – oscuridad, se pueden imitar con pulsos de luz

de 15 minutos cada 12 horas. Estos pulsos periódicos proveen un esqueleto del fotoperíodo real, por lo que estos protocolos reciben el nombre de fotoperíodo esqueleto. No es probable que los pulsos de luz imiten el amanecer real y el crepúsculo real. Sin embargo, los fotoperíodos esqueleto si pueden imitar fotoperíodos completos razonablemente bien en algunos organismos.

El foto período esqueleto proporciona una sincronización de dos pulsos por ciclo circadiano. Según este modelo, el cambio de la primera fase menos el cambio de la segunda fase debe ser igual a  $\tau - T$ .

Un punto interesante con este modelo es que el ángulo de fase del marcapasos circadiano es mucho más estable bajo un a sincronización de dos pulsos que bajo una sincronización de un solo pulso. El ángulo de fase se puede definir como la diferencia expresada en horas o en grados entre el pico de un oscilador impulsado y el pico en un oscilador sincronizado.

En la mayor parte del mundo, excepto a nivel del Ecuador, la duración del día y la noche varía según las estaciones del año, esto representa un reto para la sincronización al ambiente de los organismos. Colin Pittendrigh y Serge Daan describieron que el modelo discreto puede imitar la sincronización por estaciones utilizando combinaciones realistas entre el período en libre curso y las curvas de respuesta de cambio de fase (por ejemplo, al combinar un ritmo en libre curso de 25 horas con una curva predominantemente de adelanto de fase y una proporción grande de avance – retraso). Una diferencia notable entre el modelo discreto y el modelo continuo de sincronización tiene que ver con los ajustes de fase y periodo. En el modelo discreto, el período en libre curso se toma generalmente como constante, y se ajusta a  $T$  solo por medio de cambios de fase causados por un cambio abrupto de luz de amanecer o

crepúsculo. Por otro lado, el modelo continuo anticipa la modulación del período del reloj en libre curso continuamente a través del día (revisado en Dunlap *et al*, 2004).

### **2.3 Enmascaramiento.**

Un sistema circadiano debe tener una entrada de información ambiental a través de los órganos de los sentidos y una salida en respuestas fisiológicas y conductuales. En una medición indirecta cualquier cosa que pueda interferir entre la entrada y la salida puede enmascarar el estado real del oscilador. El reloj no se ve afectado pero el ritmo abierto no se expresa porque a veces puede ser perjudicial para el animal. La forma en que se puede distinguir una sincronización de un enmascaramiento es mediante los siguientes criterios:

1) Después de interrumpir los ciclos sincronizadores se observa el ritmo en condiciones de libre curso. Se espera que la fase del ritmo el primer día en condiciones constantes corresponda a la esperada cuando se mantuvo en ciclos de LO.

2) Ante un cambio en el horario del fotoperíodo por ejemplo, un avance o un retraso en la hora de encendido y de apagado de la luz, el ritmo manifiesto presentará una serie de ciclos transitorios que lentamente llevan al acoplamiento con un a fase estable con el nuevo fotoperíodo (revisado en Dunlap *et al*, 2004).

## 2.4 La compensación de la temperatura

Los ritmos circadianos compensan la temperatura, de tal forma que ante cambios ambientales en la temperatura ambiental, la velocidad angular en el reloj se ve escasamente afectada. Ello significa que si en todas las reacciones de temperatura un aumento en 10 grados centígrados incrementa dos a tres veces la velocidad de reacción ( $Q_{10}=2$  o  $3$ ), ante cambios semejantes de temperatura el periodo del ritmo se mantiene ( $Q_{10} = 1$ ).

## 3. ORGANIZACIÓN CIRCADIANA EN VERTEBRADOS NO MAMÍFEROS.

El sistema circadiano en vertebrados no mamíferos es multioscilandor por naturaleza, con varias entradas fóticas. Aparentemente una gran variedad de tejidos son capaces de expresar oscilaciones auto sostenidas que rápidamente se amortiguan en condiciones constantes *in vitro*. El o los marcapasos son estructuras que también regulan y coordinan a los osciladores periféricos o “esclavos”. Se dice que una estructura es un marcapasos para una conducta rítmica en particular cuando:

- 1) Al quitarlo desaparece el ritmo manifiesto.
- 2) En condiciones *in Vitro*, la oscilación de alguna variable biológica del marcapasos persiste.
- 3) Al transplantarlo en un animal al que se le ha lesionado la misma estructura se reestablece el ritmo con la fase del donador.

En los vertebrados no mamíferos las estructuras que cumplen parcial o totalmente estos requisitos son: la glándula pineal, La región análoga al núcleo supraquiasmático del hipotálamo, y los ojos. Estos sitios se encuentran relacionados y conectados vía hormonal y neural (Underwood, 2001).

La razón por la cual el sistema circadiano tenga una organización consistente en múltiples osciladores, donde la luz puede afectar a diferentes niveles, se puede explicar evolutivamente; tal vez los primeros organismos utilizaban fotorreceptores extrarretinales antes de que la evolución les otorgara un sistema visual más complejo y por alguna razón estos fotorreceptores se conservaron en algunos organismos y en otros no. Actualmente tanto los fotorreceptores como el sistema visual recogen diferente tipo de información que les ayuda a tener un mejor panorama del ambiente que les rodea. El papel de la hormona pineal melatonina de mediar la información fotoperiódica, también parece tener una explicación evolutiva. En organismos primitivos la melatonina parecía ser un mediador de señales fotoperiódicas pero solo dentro de los ojos o del órgano pineal, no de manera comunicante como ahora. Un sistema redundante de marcapasos múltiples con entradas variadas de información le podría ayudar a los organismos a sobrevivir en un ambiente al cual se deben de estar adaptando constantemente, y al obtener esta ampliación en la organización fue necesario contar con un medio de comunicación como la melatonina (Underwood, 2001).

El sistema circadiano de mamíferos presenta varias diferencias con el sistema circadiano de vertebrados no mamíferos, aunque algunos de sus componentes claramente se derivan de éstos, como por ejemplo el Núcleo Supraquiasmático (NSQ). Se pueden distinguir las siguientes diferencias: 1) En mamíferos, el órgano pineal no es autónomo y la síntesis de la melatonina en la pineal es controlada por el NSQ; 2) No existe la foto recepción extraocular en mamíferos, las entradas de luz ocurren exclusivamente por medio de los ojos; 3) El marcapasos principal en mamíferos reside en el NSQ;

4) Los receptores de melatonina son menos abundantes en el cerebro de los mamíferos que en los vertebrados no mamíferos.

El sistema circadiano de los mamíferos es más cercano a sus ancestros reptiles que a las aves. El porqué no existen fotorreceptores extrarretinales en los mamíferos se puede explicar desde el punto de vista de que los organismos que se desarrollan en huevos, reciben mayor cantidad de estímulos de luz durante su desarrollo que los animales que se desarrollan en útero. La pérdida de los fotorreceptores extrarretinales se piensa que se produjo durante un “cuello de botella” nocturno en la evolución de los mamíferos (Menaker, 1997).

### **3.1 Fotorreceptores Circadianos.**

El papel de ojos en el sistema circadiano asume que éstos son capaces de percibir la información luminosa del ambiente y envía esta información a los relojes circadianos localizados en otro lugar. No ocurre en todos los casos pero los ojos pueden tener un papel más complejo, pudiendo por si mismo ser la ubicación de un oscilador circadiano que interactúa con otros relojes para controlar las respuestas de los organismos a los estímulos de luz.

Se ha demostrado que cantidades significantes de luz pueden penetrar en el tejido cerebral de los vertebrados y que la luz de longitud de onda larga penetra más que las de onda corta. La sincronización en animales sin ojos o visualmente ciegos persiste después de quitar la glándula pineal, ya que existen fotorreceptores extrarretinales que median la sincronización, la cual se ha dado en ciclos LO con una intensidad de luz equivalente a la luna llena. Se sabe que estos fotorreceptores se ubican en el cerebro, porque al bloquear la

entrada de luz a la cabeza interrumpe la sincronización en gorriones caseros ciegos, ranas y lagartijas (Underwood, 2001). Existen estudios de inmunohistoquímica en cerebro de iguanas donde se encuentran células posiblemente fotorreceptoras en el diencefalo basal (Grace et al, 1996).

Foster y Follet en 1985, demostraron que los fotorreceptores extrarretinales que intervienen en la respuesta reproductiva al fotoperíodo (de acuerdo a la iluminación estacional) en la codorniz japonesa, utiliza el foto pigmento rodopsina. Hasta el momento se han ubicado los posibles fotorreceptores extrarretinales en la sección media basal del hipotálamo. La codorniz y el pato también poseen neuronas entre las áreas septal y tubelar del cerebro que se pueden marcar con anticuerpos de antiopsina. Foster y sus colaboradores han propuesto que las paredes adyacentes al fluido cefalorraquídeo en el cerebro puede contener una gran cantidad de fotorreceptores y que es en ese sitio donde se encuentran los receptores extrarretinales en lampreas, reptiles y aves (Foster et. al, 1993). La identificación de estos sitios permitirá diseñar estudios para determinar si están involucrados en la sincronización o en respuestas fotoperiódicas (revisado en Underwood, 2001).

Foster y sus colegas han propuesto que los fotorreceptores retinales y extrarretinales coexisten en vertebrados no mamíferos: la naturaleza óptica de los ojos le permite recrear una representación del ambiente, una gran cantidad de fotones le ayuda a construir una imagen espacial del mundo, los ojos miden la brillantez de la luz en un punto determinado (radianza) mas no de todo el

espectro ambiental (irradianza). Para la sincronización fótica de los marcapasos se necesita percibir los cambios de luz durante el día, es decir, la irradianza, los receptores extrarretinales pueden captarla, ya que los tejidos superiores esparcen la luz. Los mamíferos carecen de fotorreceptores extrarretinales, por ello se ha propuesto que las células ganglionares de la retina son capaces de captar la irradianza (Foster et al, 1994).

### **3.2 La glándula pineal como fotorreceptor y como oscilador**

Virtualmente todos los vertebrados poseen un órgano pineal. Este órgano se origina de la evaginación del techo del diencefalo y en el adulto se comunica con el cerebro por medio de un tallo. En la mayoría de los organismos se localiza en la superficie dorsal del cerebro, el cual es un lugar accesible y conveniente para su investigación. En vertebrados no mamíferos (peces, reptiles y aves) existe un segundo componente del sistema pineal, el cual se conoce como órgano parapineal u ojo parietal y también se origina del techo del diencefalo, pero se localiza de manera más superficial en una posición inmediatamente debajo del cráneo. El órgano parapineal no se presenta en serpientes, tortugas, y sapos.

El órgano parapineal posee tanto neuronas como células fotosensibles y se ha demostrado con estudios tanto inmunohistoquímicos como electrofisiológicos la evidencia de foto recepción, así también en el órgano pineal. En general, el órgano parapineal es capaz de mostrar respuesta cromática (discriminación de color en longitud de ondas de luz) mientras que el órgano pineal presenta respuesta acromática (carente de color). Tanto en

aves como en mamíferos la función fotorreceptora del órgano pineal es inexistente (revisado en Underwood, 2001).

La glándula pineal en vertebrados no mamíferos es tanto un fotorreceptor como un oscilador circadiano, en ella se sintetiza la hormona indolamina conocida como melatonina, la cual se libera al torrente sanguíneo. Los ojos, la glándula Harderiana y las células enterocromáticas también pueden producir melatonina pero no se ha demostrado que éstas últimas tengan la función de marcapasos y mucho menos que las cantidades de melatonina producida sean significativamente parecidas a las producidas por la glándula pineal.

### **3.3 Efectos de remoción del órgano pineal y de su trasplante.**

Estudios realizados mediante pinealectomía y trasplantes, metabolismo de indolaminas y la aplicación de la melatonina, sugieren que el centro del reloj circadiano se comunica con el resto de los componentes por medio de ésta hormona. La pinealectomía y los trasplantes de glándula pineal pueden provocar cambio de periodo, partición del ritmo (*splitting en inglés*), o arritmia en vertebrados no mamíferos (Menaker, 1997. Miranda Anaya et al, 2006, Corona-Lagunas, 2004). Estudios de la pineal en cultivo extraída de peces, reptiles, y aves, han demostrado que el ritmo de secreción de melatonina y de su enzima de síntesis la N-acetil transferasa (NAT) se pueden sincronizar por ciclos de LO de 24 horas, también se mantiene rítmico en condiciones constantes por varios ciclos. En varias especies: como la lamprea *Petromyzon marinus*, la lagartija *Dipsosaurus dorsalis*, el gueko nocturno *Christinus marmoratus*, la trucha *Salmo gairdneri*, y la codorniz japonesa *Coturnix*

*coturnix* se observó que en LO se expresaba un ritmo, pero en OO no ocurría (revisado en Underwood, 2001). La mayoría de las especies en que se observa ritmicidad en oscuridad constante (OO) tiende a amortiguarse, tal vez un reloj circadiano controla el ritmo de secreción de melatonina sin embargo, la persistencia del ritmo depende de la temperatura (Barret y Takahashi, 1997).

La glándula pineal también puede actuar como un sitio de marcapasos circadiano. Debido a la importancia que presenta se lo ha descrito tanto neural como endocrinamente y de acuerdo a estas descripciones se cuenta con material suficiente para una discusión sobre su papel de fotorreceptor y reloj biológico.

El clásico experimento de remover o transplantar el órgano pineal y observar los efectos en el ritmo de actividad locomotriz se ha utilizado en peces, reptiles y aves. Las respuestas varían, por ejemplo en la codorniz japonesa no se ve un efecto cuantificable, en cambio otras especies de aves (gorriones caseros y pinzón casero) y reptiles (*Anolis carolinensis* y *Gallotia galloti*) se presentan arritmia o partición del ritmo (*splitting en inglés*), entre otros. En otras especies pueden mostrar más de una respuesta. Por ejemplo, en la lagartija *Sceloporus occidentalis*, la pinealectomía provoca “splitting” en dos componentes, cambio en el período, o arritmia; y en una curva de respuesta de fase se puede apreciar un aumento del área en la zona de los atrasos (Underwood, 1983).

Los efectos de cambios de ritmicidad que se pueden ver en los diversos estudios realizados, son compatibles con la hipótesis de que la pineal es un oscilador marcapasos. El hecho de que se siga presentando cierta ritmicidad en muchos casos después de haber quitado el órgano pineal demuestra que

éste no debe de ser el único sitio que la genere. Los diferentes efectos observados con la pinealectomía se pueden explicar mediante la solidez del acoplamiento entre los diferentes osciladores extra pineales (revisado en Underwood, 2001).

La hipótesis de que el órgano es un marcapasos, se comprueba con los estudios de transplantes de pineal y estudios in vitro de metabolismo pineal. En el caso de los gorriones caseros *Passer domesticus*, al quitar la pineal y colocar el animal en OO se pierde la ritmicidad, pero si se restituye el órgano pineal en la cámara anterior del globo ocular del gorrión arrítmico, la ritmicidad se recupera (Zimmerman y Menaker, 1979).

En estudios de cultivos de órgano pineal en peces, reptiles y aves se ha podido observar que el ritmo de actividad de la enzima de síntesis NAT y la secreción de melatonina se puede sincronizar a 24 horas en ciclo LO. En muchos casos, estos ritmos persisten bajo condiciones constantes por un lapso de varios ciclos. (Barrett y Takahashi, 1997; Bolliet, *et al*, 1994; Takahashi y Menaker, 1984; Takahashi et al., 1989).

El órgano pineal se relaciona con otros osciladores circadianos, aparentemente de manera endocrina y que responden de manera similar a los impulsos fóticos para generar una respuesta única coherente. La evidencia sugiere que las células fotosensibles del órgano pineal son el sitio donde se produce la melatonina y también es el sitio de los osciladores circadianos (Dubocovich et. al, 1995).

### **3.4 Los ojos como reloj circadiano.**

En los ojos de tres clases de vertebrados (codorniz japonesa *Coturnix coturnix japónica*, gallina y en *Xenopus laevis*) existe un reloj circadiano que controla el ritmo de metabolismo de indolaminas. En la rana africana *Xenopus laevis* se ha visto ritmo de actividad de NAT, triptofano hidroxilasa, y síntesis de melatonina que se sincronizan con luz y persisten en la oscuridad (Cahill y Besharse, 1991).

Otros estudios sugieren que el reloj de los ojos puede jugar un papel significativo en el sistema circadiano general del animal, es decir, el ojo puede actuar como un marcapasos. Por ejemplo, al cegar a la codorniz japonesa se interrumpen los ritmos circadianos de actividad locomotriz y de temperatura corporal. En el caso de la paloma se interrumpe el ritmo de actividad locomotriz siempre y cuando se conjunte con pinealectomía.

Algunas observaciones sugieren que el ojo de la codorniz japonesa se comunica con el resto del sistema circadiano por vía neural y hormonal. Se cree que la melatonina es el enlace hormonal que contribuye en esta comunicación debido a que: el ojo la produce en gran cantidad. La administración continua de melatonina vía subcutánea produce acortamiento del periodo del ritmo, o también arritmia y la administración diaria de melatonina por medio del agua puede sincronizar el ritmo de temperatura corporal. En el caso de los pericos, pollos y gorriones al remover los ojos la concentración de melatonina en sangre disminuye de manera insignificante, lo cual sugiere que los ojos de estos animales no son el sitio principal de producción de melatonina.

La presencia de ritmo de la sensibilidad visual en los ojos de vertebrados no mamíferos, sugiere que la manera en como se percibe la luz puede influenciar a los osciladores circadianos. La melatonina dentro del ojo parece actuar como controlador parahormonal de algunos ritmos oculares tales como: migración y desprendimiento de discos distales, movimientos retinomotores y migración de pigmentos. Estudios histoquímicos sugieren que la síntesis de melatonina se lleva a cabo en las células retinales fotorreceptoras (Underwood, 2001).

También existe en la retina una relación estrecha entre la melatonina y la dopamina (catecolamina predominante en la retina de muchos vertebrados) con la luz. La dopamina parece mediar señales de luz, mientras que la melatonina media señales de oscuridad. La exposición a la luz incrementa la producción y liberación de dopamina y la activación de los receptores de D<sub>2</sub> dopamina en las células productoras de melatonina, provocando una supresión de la actividad de NAT. A la inversa, en la oscuridad, la producción de melatonina activa los receptores de dopamina de las células productoras de dopamina, inhibiendo la actividad de esta. La dopamina también parece actuar en la sincronización de los osciladores circadianos oculares de reptiles (Miranda Anaya *et al*, 2002).

### **3.5 Núcleo Supraquiasmático.**

Debido a que ciertos ritmos persisten aun después de pinealectomía y remoción de los ojos de vertebrados no mamíferos, está claro que el órgano pineal y los ojos no son los únicos sitios del marcapasos circadiano. En mamíferos se ha observado que el marcapasos es el Núcleo Supraquiasmático (NSQ) y la ritmicidad presentada por la glándula pineal no es autónoma por si misma, sino que recibe impulsos eléctricos del NSQ vía sistema nervioso simpático. En mamíferos el NSQ no sólo controla la ritmicidad de la melatonina, también presenta receptores a la misma, lo que lo hace una estructura sensible a ella.

Con respecto al estudio del NSQ en vertebrados no mamíferos se le han dado numerosos nombres a las zonas equivalentes del NSQ lo que se presta a confusiones. La estructura análoga al NQS se conoce mejor en aves donde se han identificado dos zonas principales: Núcleo hipotalámico medio (NHM) y Núcleo retinoreciciente lateral hipotalámico (NRLH). Ambos núcleos pueden recibir impulsos nerviosos de la retina. Estudios inmunohistoquímicos han mostrado similitudes entre las zonas NHM y NRLH de las aves y el NSQ de los mamíferos, pero no se ha observado aún una homología completa (Dubocovich *et al*, 1995).

Algunos investigadores han lesionado las áreas NHM en aves y lagartijas para determinar si las lesiones poseen un efecto en el ritmo de actividad locomotriz de los animales conservados en condiciones de OO. Se han realizado dos estudios en la iguana del desierto en la que al lesionar el área medio hipotalámica pueden causar arritmia en el ciclo de actividad

locomotriz en OO y se observó arritmia en animales con daño entre el 80-90% del área supraquiasmática (Janik y Menaker, 1994).

Hasta el momento, en aves, reptiles y peces se ha observado que el daño o remoción de NHM, en NRLH, o en ambos puede causar la alteración o interrupción del ritmo, pero aún es necesaria más investigación para determinar una homología con el NSQ de mamíferos. Ya que la melatonina tiene mayor efecto en los ritmos de vertebrados no mamíferos, la melatonina originada en la pineal y en los ojos debe de afectar los marcapasos circadianos en el área supraquiasmática de manera directa o indirecta. En vertebrados no mamíferos los receptores de melatonina se han encontrado en áreas homólogas al NSQ, áreas asociadas con procesamiento sensorial y de estímulos de luz (Cassone, 1998).

En aves, en algunos peces y lagartijas se ha observado que la pinealectomía y remoción de los ojos causa arritmia, demostrando que el resto del sistema no es autosuficiente o que los osciladores remanentes aún son autosuficientes, pero se desfasan unos de otros. En estos mismos animales, la interacción órgano pineal-NSQ u Ojo-NSQ parece ser necesaria para mantener la persistencia del ritmo. Los rangos de reacción a la pinealectomía en aves y lagartijas son muy similares, por lo que se sugiere que el sistema circadiano es similar en ambos grupos.

También es interesante destacar que la pinealectomía casi no tiene efecto en la actividad circadiana de la iguana del desierto, o en la actividad y regulación de temperatura corporal de la codorniz japonesa. El órgano pineal de ambas especies no muestra actividad in vitro. En este caso no debe restarse importancia al órgano pineal ya que es probable que en su ausencia

otras estructuras desempeñen el papel de mantener el ritmo. Puede ser que en estas especies el órgano pineal sea un transductor de impulsos de luz, o termo endocrino, que permite que la luz y/o temperatura externa influyeran en el sistema circadiano.

#### **4. LA MELATONINA.**

La melatonina es una indolamina secretada rítmicamente por la glándula pineal. Es sintetizada a partir de la serotonina (5-HT) a través de la N-acetiltransferasa, para transformar la 5-hidroxitriptamina, o serotonina en N-acetil-5-hidroxitriptamina y por el Hidroxiindol-O-metiltransferasa para transformar la N-acetil-5-hidroxitriptamina en N-acetil-5-metoxitriptamina, o melatonina (Shiu, 1996).

La última enzima en la síntesis de la melatonina es la hydroxyindole-O-methyltransferasa (HIOMT) y originalmente se encontró solo en tejidos de la glándula pineal, sugiriendo que la melatonina y metoxyindolaminas relacionadas son productos únicamente pineales. A pesar de que la glándula pineal es el principal productor de melatonina, otros tejidos neurales y neuroendócrinos también son capaces de producirla: incluyendo los ojos, la glándula paratiroides, y células enterocromafinas ubicadas en el tracto alimenticio. La melatonina producida no se almacena, sino que se vierte en el torrente sanguíneo (Ralph, 1981). Tanto la luz como la temperatura son importantes en la sincronización de la producción de indolaminas en poiquilótermos (animal cuya temperatura corporal sigue aproximadamente la ambiental), en estos las concentraciones de melatonina reflejan el tipo de ambiente físico al que están expuestos (revisado en Underwood, 2001)

Su fase máxima de síntesis es durante el período de oscuridad del ciclo de luz-oscuridad y es altamente controlado por el fotoperíodo (Pévet *et al*, 1995). La melatonina presenta afinidades químicas con el neurotransmisor serotonina y la hormona vegetal auxina (Menaker, 1997). No se puede otorgar una función única a la melatonina, ya que se encuentra involucrada en la regulación de diferentes procesos fisiológicos y conductuales involucrados con la captación de luz, respuestas reproductivas en vertebrados, migración entre otras. Los cambios naturales o experimentales del fotoperíodo modifican los patrones temporales de producción de melatonina, la cual es controlada por relojes internos y es modificada por ciclos de luz oscuridad. En muchos mamíferos estudiados, las concentraciones mayores de melatonina son proporcionales a la duración de la fase nocturna, este dato sugiere que los cambios en el patrón de producción de melatonina es la llave en la transmisión de la información sobre el foto periodo hacia el sistema nervioso central (Menaker, 1997).

Una función general de la melatonina se puede describir como el proveer una señal que informa sobre los cambios de iluminación durante el día dentro del organismo, y que genera un marco temporal alrededor del cual se pueden organizar eventos internos. La melatonina se sintetiza durante la noche y es liberada al torrente sanguíneo en combinación con moléculas solubles en lípidos.

#### **4.1 Localización y papel fisiológico de los receptores de melatonina en el sistema circadiano.**

Los receptores de melatonina que se encuentran en la retina podrían mediar los procesos adaptativos a oscuridad del ojo e inhibir el sistema dopaminérgico en los ojos e influenciar la transmisión de señales de luz al cerebro; también se encuentran en el NSQ del hipotálamo, un área que recibe impulsos directos de la retina y se piensa que contiene un marcapasos circadiano. Estudios realizados con el ligando específico 2-[<sup>125</sup>I]-indomelatonina, indican la presencia de receptores de melatonina en áreas del cerebro que reciben impulsos directos de la retina. Se ha demostrado en el cerebro de conejillos de indias que el 2-[<sup>125</sup>I]-indomelatonina tiene dos áreas retinorecipientes: coliculus superior y núcleo lateral geniculado. El cerebro de aves y anfibios presenta varias áreas retinorecipientes que muestran actividad 2-[<sup>125</sup>I]-indomelatonina. En el cerebro de pollo, en la sección coronal, los ligandos se presentan en el tectum óptico, en el núcleo geniculado dorsolateral y lateroventral, masa gris tectal, núcleo de la raíz óptica basal, y la región dorsolateral anterior del tálamo. Estos datos sugieren que la melatonina modula procesos de la información visual en el primer nivel de análisis cerebral.

En el cerebro de pollos, los ligandos específicos de 2-[<sup>125</sup>I]-indomelatonina se encuentran a lo largo de la ruta mayor de pulsos de información visual, la ruta tectofugal (retina – tectum – núcleo rotundus – ectostriatum – periectostriatum). Niveles bajos del ligando específico 2-[<sup>125</sup>I]-indomelatonina se encontraron en la ruta visual talamofugal (retina – tálamo – hiperstriatum). Los patrones de unión de 2-[<sup>125</sup>I]-indomelatonina en aves sugieren que la melatonina regula señales entrantes de luz y percepción visual,

ritmicidad circadiana, y reflejos oculares mediados por luz. Estos sitios de unión centrales presentan características farmacológicas de los receptores de melatonina ML-1 (Cassone and Brooks, 1991).

#### **4.2 Papel de la melatonina en el sistema circadiano de vertebrados no mamíferos.**

Numerosos estudios han indicado que la melatonina tiene el papel de comunicar información entre el órgano pineal y el resto del sistema circadiano. Aunque la melatonina se puede sintetizar en sitios extrapineales, en muchos casos, la pineal parece ser el sitio principal de síntesis y liberación de esta hormona. Si se extrae la fuente de producción principal de melatonina se producen efectos dramáticos en el sistema circadiano, además que la administración exógena de melatonina puede afectar significativamente el sistema circadiano. La administración diaria de melatonina, ya sea por inyección subcutánea o en agua, puede causar cambios en el periodo del ritmo de libre curso en aves y lagartijas (Underwood, 2001). Los niveles administrados de melatonina son de tipo suprafisiológicos. Los cambios de ritmos observados también se pueden ver en animales pinealectomizados. Los receptores de melatonina en el NSQ también están relacionados con la habilidad de la melatonina de sincronizar y reiniciar la fase de un ritmo circadiano.

Estudios en aves y anfibios sugieren que la melatonina también puede modular el proceso de la información visual a lo largo de toda la vía visual

central. En algunas especies, por ejemplo aves, la melatonina actúa en procesos como la discriminación de intensidad de brillo de la luz, y controla reflejos oculares y visuales. En reptiles está involucrada en las respuestas eléctricas del ojo ante la luz (Miranda-Anaya et al, 2002). Hasta el momento se ha demostrado que la regulación e inhibición presináptica del AMP cíclico son reguladas por la melatonina en el nivel celular (Dubocovich, 1995).

## **5. BIOLOGÍA DE LA LAGARTIJA *Sceloporus torquatus*:**

### **5.1 Taxonomía y características morfológicas**

Orden: *sauria*.

Familia: *Phrynosomatidae* (reptilia)

Género: *Sceloporus*

Especie: *torquatus*.

Es una lagartija robusta de talla mediana, con largo hocico-cola de 87.3 mm  $\pm$  8 mm, y largo hasta la cola de 103.4 mm  $\pm$  16 mm. Los machos por lo general son unos 5 mm más largos que las hembras, de color canela verdoso a canela oscuro, siendo notable un collar negro bordeado a ambos lados por una línea color verde turquesa. Las escamas de la cabeza son lisas, sobresalen por mayor tamaño las frontales e interparietales; las supraoculares se presentan en una sola hilera; los lóbulos del borde anterior de la abertura del oído, en número de tres, son más grandes que los que preceden a estos. Las escamas dorsales, contadas del occipucio a la base de la cola (a lo largo de la línea medio dorsal), se presentan en hileras paralelas, son ligeramente quilladas y mucronadas, con una media de 29.8 en hembras y de 30.4 en machos; el número mínimo es de 26 y el máximo es de 37 hileras.

La superficie dorsal del cuerpo es canela verde oscura con manchas claras triangulares. En la parte media dorsal del cuello se presenta un collar negro de cuatro o cinco escamas de ancho, bordeado tanto en su parte anterior como en la posterior, por una línea amarillo claro o verde claro, verde amarillento del ancho de una escama, la que se interrumpe en la parte media dorsal. La región gular en hembras y jóvenes está adornada de densos puntos de color amarillo claro y en los machos adultos es de color gris oscuro hacia los bordes.

## **5.2 Hábitat y distribución**

Vive en comunidades de bosque de encino y de pino-encino, generalmente a una altitud de 2500-2700 m; no se ha localizado en montañas que sobrepasan esas alturas; a esta subespecie se le puede encontrar en un microhábitat de rocas agrietadas. Es de actividad diurna, saxícola y de comportamiento territorial; se le puede encontrar en las horas más calientes de los días soleados; su área de actividad apenas abarca de tres a cinco metros de distancia de las grietas de las rocas donde viven. Respecto a los hábitos alimenticios se ha visto que esta especie es fundamentalmente insectívora ya que se encontraron en su contenido estomacal insectos de los órdenes Diptera, Hymenoptera, Homoptera, Lepidoptera, Hemíptera y Coleptera, entre otros; sin embargo, esta especie se puede alimentar de otras especies de lagartijas, por ejemplo, *Sceloporus areneus*; además Burques & Flores-Villela encontraron restos vegetales en el estómago de un ejemplar. Esta lagartija se encuentra en los estados de Guanajuato, Hidalgo, México, Michoacán,

Morelos, Puebla, Tamaulipas, Veracruz y el Distrito Federal (Uribe-Peña et al, 1999).

### **5.3 Ciclo reproductivo.**

Es de actividad reproductiva otoñal vivípara; los machos tienen actividad reproductiva durante la primavera. Feria y Ortiz (1986) registró que la actividad reproductiva comienza en octubre, ocurriendo los nacimientos entre abril y mayo y que las crías maduran en octubre del siguiente año. La camada es de ocho individuos.

A mediados del verano se inicia el desarrollo testicular en machos (julio - agosto) y es hasta septiembre – octubre cuando alcanzan su máximo volumen y peso. Entre octubre y noviembre comienza y se acentúa la regresión testicular. Las hembras comienzan su actividad ovárica en junio, iniciando el proceso de vitelogénesis a finales del verano (septiembre – noviembre), por octubre se encuentran de uno a cinco folículos preovulatorios por ovario y la ovulación culmina durante noviembre o diciembre. Las hembras son preñadas durante el otoño y la gestación dura aproximadamente cinco meses. El desarrollo embrionario es relativamente lento durante los primeros meses de gestación (diciembre a febrero, cuando la temperatura es más baja), se incrementa durante marzo y abril para parir en primavera (principios de mayo). El número de huevos oviductales por hembra varía de 3 a 10 (Guillete y Mendez de la Cruz, 1993; Uribe et al., 1995, Feria et al., 2001). Los neonatos de ambos sexos alcanzan la madurez después de 5 meses y son capaces de reproducirse el primer otoño después de nacer (Uribe et al., 1995).

## 6. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El sistema circadiano en los reptiles presenta la ventaja de poseer múltiples osciladores en regiones discretas del sistema nervioso central como son la glándula pineal, el ojo parietal, las retinas y la región del hipotálamo homóloga al núcleo Supraquiasmático (Tosini *et al*, 2003). La dominancia de cada uno de estos osciladores sobre el sistema circadiano va a depender mayormente de la especie y del ritmo observado.

En la lagartija *S torquatus*, la pinealectomía produce cambios en el valor del periodo del ritmo de actividad locomotriz (Corona-Lagunas, 2004; Miranda-Anaya *et al*, 2006). Ya que la melatonina es una hormona producida y liberada rítmicamente por la glándula pineal y las retinas, y que éstas estructuras poseen un oscilador circadiano, la interacción entre otros osciladores presentes en el Sistema Nervioso Central podría ser mediada por ésta hormona. El presente trabajo estudia la acción de la melatonina, como un posible sincronizador endocrino y un restaurador en el ciclo de actividad locomotora de la lagartija *Sceloporus torquatus* con base en los trabajos realizados por H. Underwood en *S occidentalis* (1985).

Por otro lado, la luz constante produce en la mayoría de los organismos cambios fundamentales en la expresión del ritmo de actividad locomotora, tales como, cambios en el periodo del ritmo en libre curso, partición de la actividad (splitting) o inclusive arritmia. Tal efecto posiblemente sea producido por el desacoplamiento de los componentes neurales del reloj biológico, como ha sido demostrado en el núcleo supraquiasmático ratones (Yamazaki *et al*. 2005). En lagartijas también se ha observado que la luz constante produce arritmia en la actividad locomotriz del animal y la ausencia de la glándula pineal no produce

ninguna diferencia al respecto (Corona Lagunas, 2004). La síntesis de melatonina en la glándula pineal es sensible durante la exposición prolongada a la luz y de esta, la baja cantidad de melatonina afecte el acoplamiento de los osciladores del sistema circadiano de la lagartija.

## **7. HIPÓTESIS**

Si en la lagartija *S. torquatus*, la glándula pineal modula el periodo en libre curso del ritmo de actividad locomotriz, entonces la señal endocrina que tiene este efecto es la melatonina. Por lo tanto, en condición de oscuridad constante, la inyección diaria de melatonina en una dosis suprafisiologica, sincronizará el ritmo de actividad locomotriz al periodo de las inyecciones. Por otra parte, si la melatonina funciona como un acoplador interno, entonces se esperaría que la administración externa de melatonina en animales arrítmicos por luz constante, permita recuperar el ritmo de actividad locomotriz en esta condición.

## **8. OBJETIVO GENERAL.**

Determinar si la melatonina cumple la función de sincronizador interno y como acoplador del sistema circadiano en la lagartija *Sceloporus torquatus*.

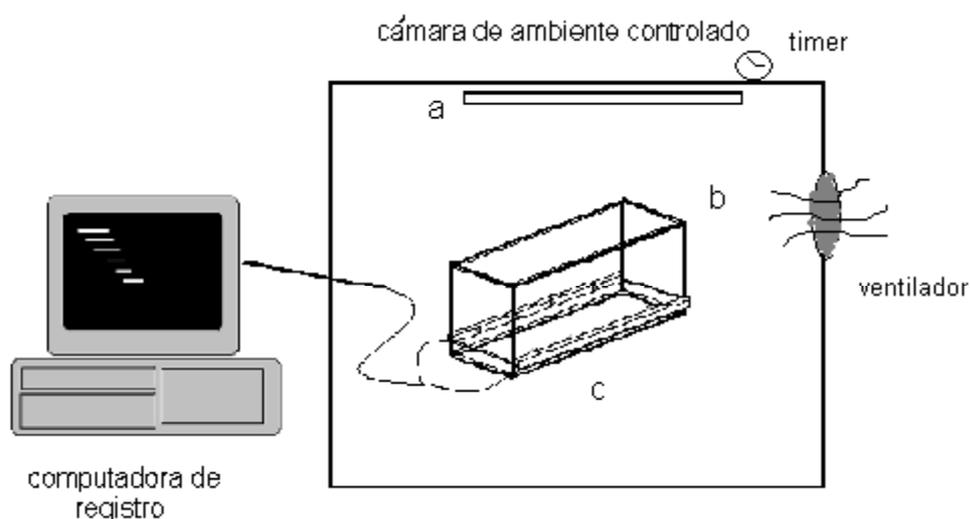
### **8.1 Objetivos particulares:**

1. Determinar si las inyecciones diarias de concentraciones suprafisiológicas de melatonina (3µg), sincronizan el ritmo de actividad locomotora en libre curso de *S torquatus* en OO.
2. Determinar si las inyecciones diarias de melatonina son efectivas para restablecer la ritmicidad circadiana, durante la arritmia observada en una condición de luz constante.
3. Observar si se presentan diferencias inter e intra individuales de los parámetros circadianos estimados como periodo, alfa y rho, así como relación de fase durante la aplicación periódica de melatonina.
4. Discutir la participación de la melatonina como un acoplador del sistema circadiano en la lagartija *Sceloporus torquatus*.

## 9. MATERIAL Y MÉTODO.

### 9.1 Obtención y mantenimiento de las lagartijas.

Las lagartijas examinadas en el presente trabajo fueron colectadas en la localidad de San Andrés Texcalyacác, Estado de México y en el Desierto de Los Leones, Distrito Federal. La captura se realizó con horquillas de hilo de caña, sujetando las lagartijas por el cuello e introduciéndolas en bolsas de manta con jareta para su traslado al laboratorio. La captura se realizó gracias al apoyo del Biólogo José León Pérez del laboratorio de vertebrados terrestres, Facultad de Ciencias, UNAM. Se capturaron un total de 14 lagartijas entre estado juvenil y adulto sin distinción de sexo: 8 en la primera localidad, y 6 en la segunda. Se mantuvieron en aclimatación el herpetario de la Facultad de Ciencias de la UNAM durante al menos una semana y con el fotoperíodo natural. Durante los experimentos fueron alimentadas *ad libitum* con *Tenebrio molitor* y agua.



**Figura 2** Sistema de registro de actividad, compuesto por una cámara de ambiente controlado. Dentro de la cámara se encuentra: lámpara de luz blanca (a); acuario para contener las lagartijas (b); sensores de movimiento (c) El sistema se conecta a una PC para la colección periódica de datos.

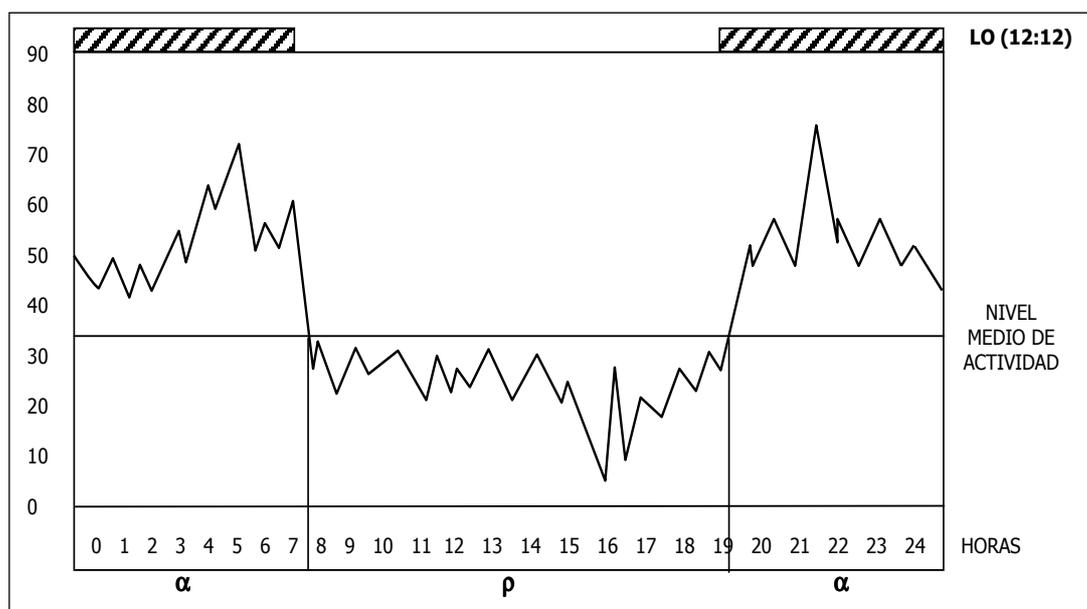
Todas las lagartijas fueron colocadas en acuarios de vidrio de 31 x 18 x 21cm. Los terrarios fueron colocados en compartimentos de madera de color negro con un sistema de ventilación constante (figura 2). El primer grupo de lagartijas se ubicó con sus casilleros en las cámaras de ambiente controlado de la Facultad de Ciencias de la UNAM, a una temperatura de 24°C, y el segundo grupo de lagartijas colectadas se ubicó en el Taller de Animales II de la Facultad de Ciencias a la misma temperatura. La actividad locomotora se registró por medio de sensores infrarrojos adaptados al terrario, cada interrupción del haz de luz representó un evento de actividad locomotora. Los datos fueron agrupados cada diez minutos, y almacenados en una computadora personal (PC) hasta su análisis.

El fotoperíodo de los terrarios se controló por medio de interruptores domésticos programables (timers). Se utilizaron lámparas de luz blanca (Philips 20 W, F20T12/D) ubicadas a 30 cm de distancia del piso de cada caja de registro, durante los ciclos de luz oscuridad (LO) encendido 06:00 apagado 18:00 h y en regímenes de luz constante (LL, 150 lx). En los regímenes de OO se utilizaron focos de baja intensidad de luz roja (1.0 lx), la cual no afecta el curso del experimento como se observó en pruebas preliminares (Corona-Lagunas, 2004).

## 9.2 Análisis de datos.

El análisis y presentación de los datos fue en forma de actograma de doble gráfica, mediante el uso del programa DISPAC (Digital Signal Processing Applied to Chronobiology, IFC UNAM). La significancia del ritmo fue obtenida mediante el análisis de los datos de cada condición por el periodograma de  $X^2$  incluida en el DISPAC (Aguilar-Roblero et al., 1997).

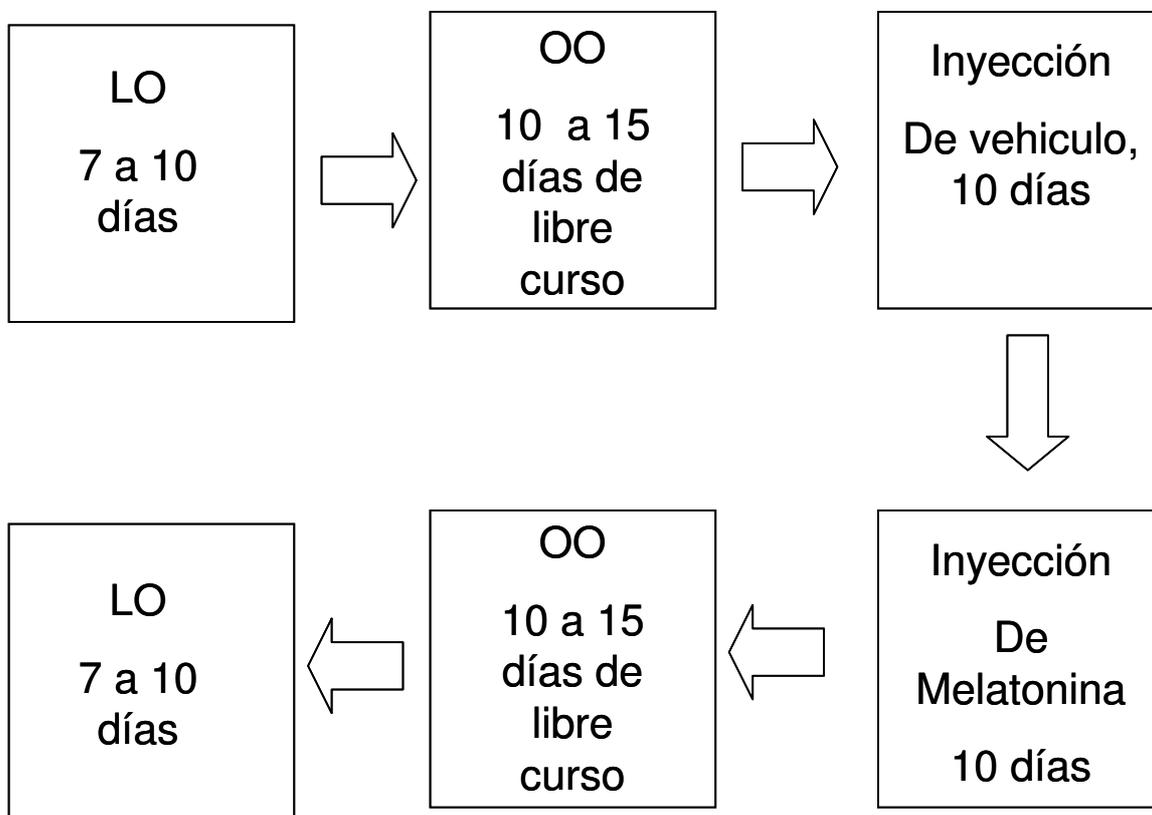
Al obtener el análisis del periodo en cada condición, se comparó tanto el efecto del vehículo como de la melatonina en el ritmo de actividad locomotriz, ya sea en libre curso en oscuridad constante como en arritmia. Cada grupo de al menos 7 días de datos en estado estable (fuera de ciclos transitorios), se usó para obtener entonces la curva promedio, ajustando los datos al periodo dominante. La anterior se promedió verticalmente con la serie de datos. La curva promedio permite averiguar la duración de la fase activa del animal ( $\alpha$ ) como la fase de reposo ( $\rho$ ), duración neta y pico máximo de actividad (fig 3).



**Figura 3:** grafica que representa en una curva de actividad, los criterios para considerar son los parámetros de actividad ( $\alpha$ ) y reposo ( $\rho$ ).

### 9.3 Diseño Experimental

**Grupo I: Efecto de la inyección diaria de melatonina sobre el ritmo de actividad en libre curso.**

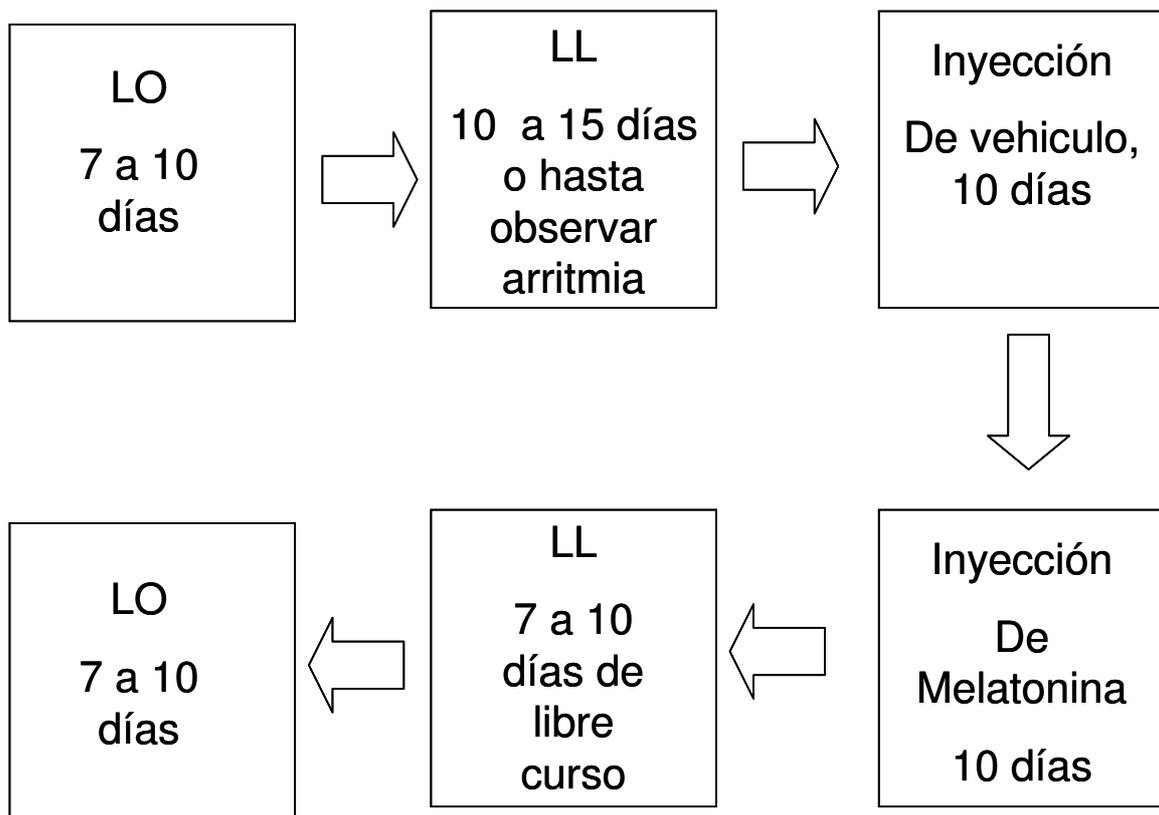


**Figura 4:** Protocolo de manipulación de los animales para la condición de oscuridad constante.

Se mantuvieron 6 lagartijas en LO durante al menos 7 días, posteriormente se impuso la condición de OO durante al menos 10 días hasta observar un ritmo estable en libre curso. Se procedió a inyectar intraperitonealmente una solución de vehículo al 1% de etanol en agua destilada durante 10 días en las mismas condiciones de iluminación. Posteriormente se procedió a inyectar diariamente, al medio día una solución de 10  $\mu$ l la cual contenía 3  $\mu$ g de melatonina (en 1% de etanol) durante al

menos 10 días. Finalmente se dejó en condiciones constantes, sin manipulación alguna durante al menos una semana más.

### Grupo II luz constante (LL)



**Figura 5:** Protocolo de manipulación de los animales para la condición de luz constante.

Se mantuvieron 6 las lagartijas durante al menos 10 días en foto período luz oscuridad (LO); posteriormente pasaron a luz constante (LL). Los datos de actividad correspondientes a la interrupción de los haces infrarrojos, fueron capturados cada 10 minutos y analizados cada tres días con la finalidad de observar si el animal presentaba actividad arrítmica. Después de detectar el

inicio de la arritmia, la captura y análisis de datos por actograma se hizo semanalmente.

Con el fin de determinar si la manipulación de la lagartija tiene un efecto sobre el ciclo de actividad locomotriz, se procedió a inyectar diariamente 10 microlitros de vehículo durante diez días. Las inyecciones se llevaron a cabo diariamente a las doce del día. Posteriormente se aplicaron las inyecciones de melatonina diariamente durante al menos 10 días, a las 12 del día. Después de este periodo, se mantuvieron en condiciones de LL sin manipulación alguna por al menos una semana antes de iniciar un foto período luz oscuridad (LO) con duración de al menos una semana.

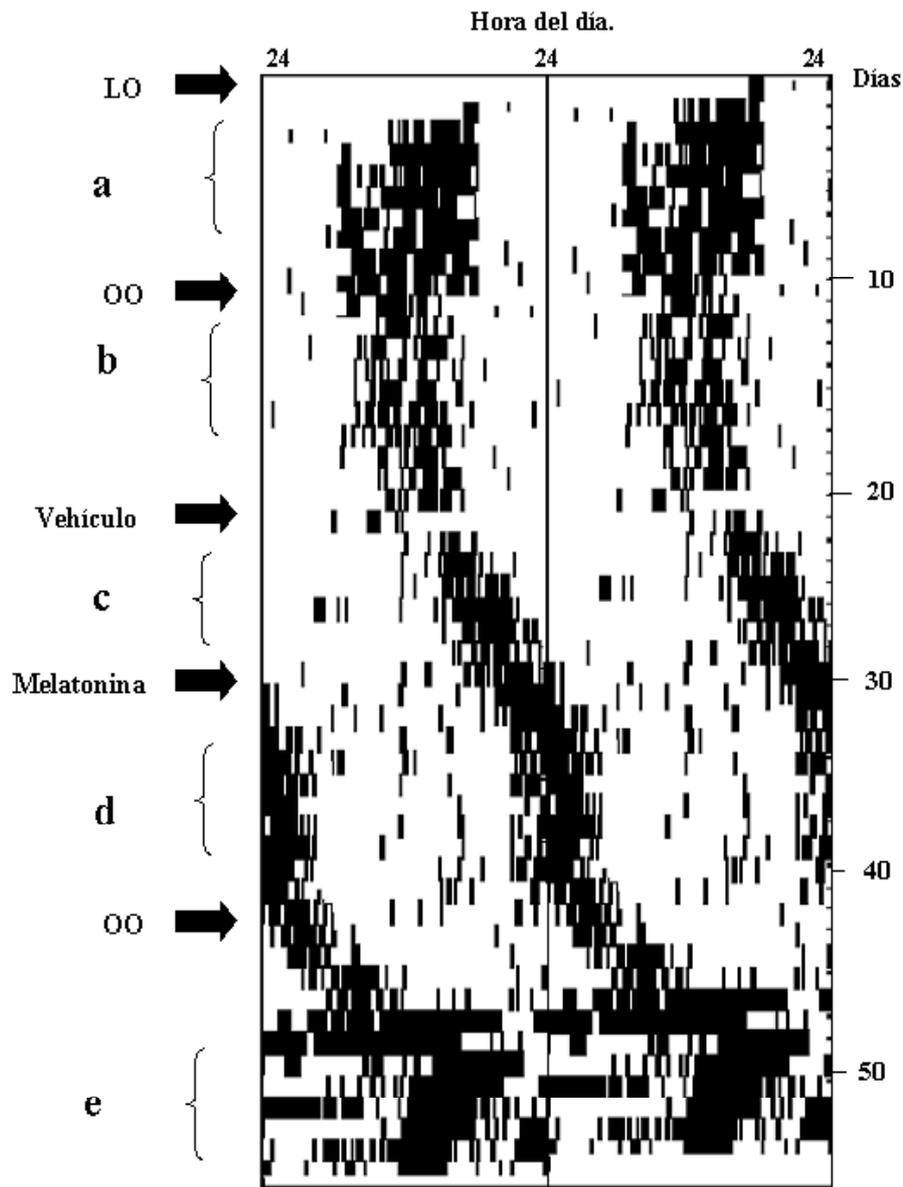
## 10. RESULTADOS

### Grupo I. Oscuridad constante:

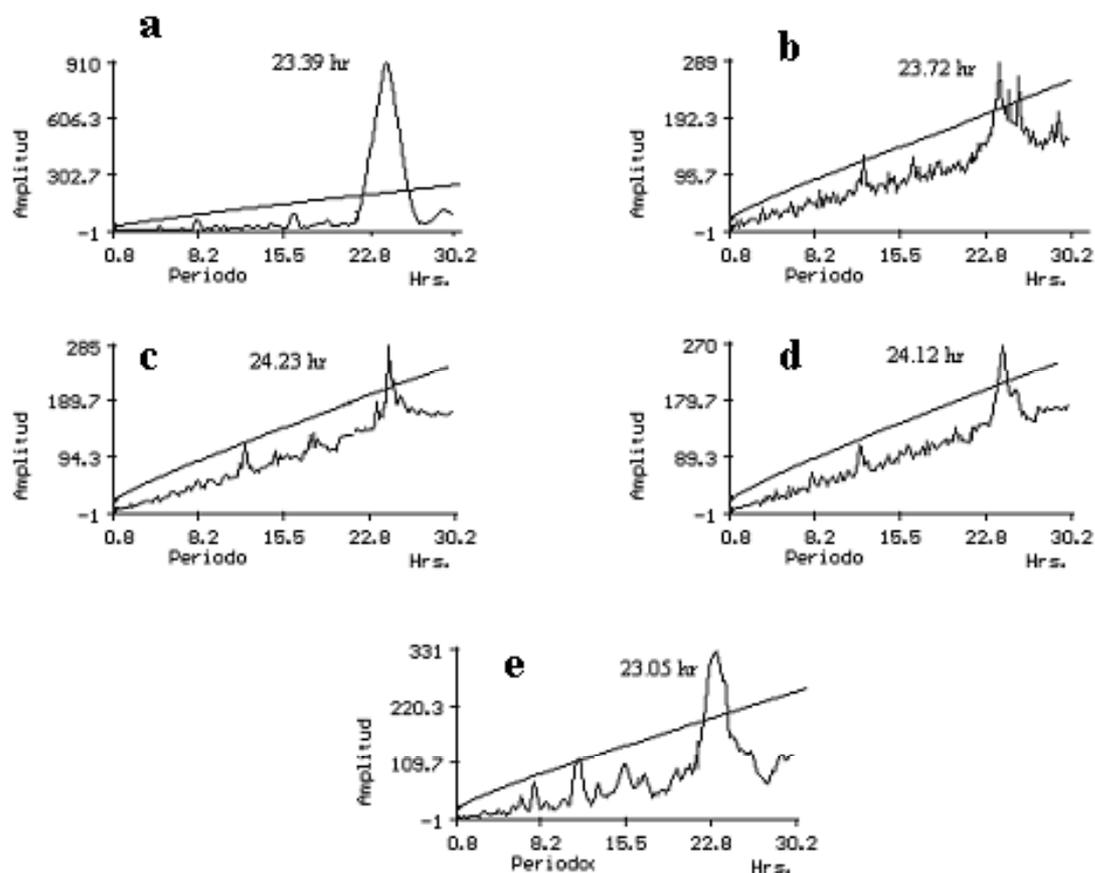
La figura 6 muestra un ejemplo del ritmo circadiano de actividad locomotriz de un animal que corresponde al primer grupo experimental, la figura 7 presenta las gráficas de los periodogramas correspondientes. Durante los primeros 12 días en ciclos de luz-oscuridad, el animal muestra un ritmo de actividad locomotora típicamente diurno, y al estar en condiciones constantes del día 13 al día 23, el periodo en libre curso es de 23.72 horas. Durante los días 24 a 31 se inyectó diariamente al medio día, una solución vehículo sin melatonina, vía intraperitoneal. El experimento se mantuvo en condiciones de luz roja tenue, incluso durante las inyecciones. Se aprecia el actograma y su correspondiente periodograma que el periodo del ritmo circadiano no sincroniza a los ciclos de manipulación e inyección cada 24 horas durante los 10 días bajo esta condición, en su lugar, presenta un periodo de 24.23 horas (periodograma C, fig 7). Desde los días 32 al 43 se aplicó diariamente una inyección con una solución de 10  $\mu$ l la cual contenía 3  $\mu$ g de melatonina disuelta en el vehículo mencionado anteriormente (etanol al 1%), el periodo del ritmo circadiano se acorta y el periodograma correspondiente indica un periodo de 24.12 horas.

El inicio de actividad del animal se adelanta y parece sincronizar con la inyección de melatonina para el tercer día posterior a la inyección. El inicio de actividad, comienza a las 20 horas del tiempo externo, lo que indica que la fase en que es interpretada la inyección de melatonina coincide con la noche subjetiva del animal. Se puede considerar que se trata de una sincronización verdadera, ya que el inicio de actividad del animal después de último día de

inyección de melatonina sigue presentando la misma fase de inicio que tenía con la melatonina. Cuando se mantiene el ritmo sin la presencia de las inyecciones, nuevamente en libre curso, el ritmo presenta un periodo largo y súbitamente a partir del día 45 se recorta con un periodo de 23.05 hr.



**Figura 6:** El actograma en formato binario, muestra el comportamiento diario del animal en el protocolo de oscuridad constante, indicando los días de inyección del vehículo y la melatonina, cada una de las condiciones a las que se sometieron a los animales: OO (oscuridad constante), LO (luz oscuridad, inicial). El segmento marcado por e corresponde a la condición de LO final.

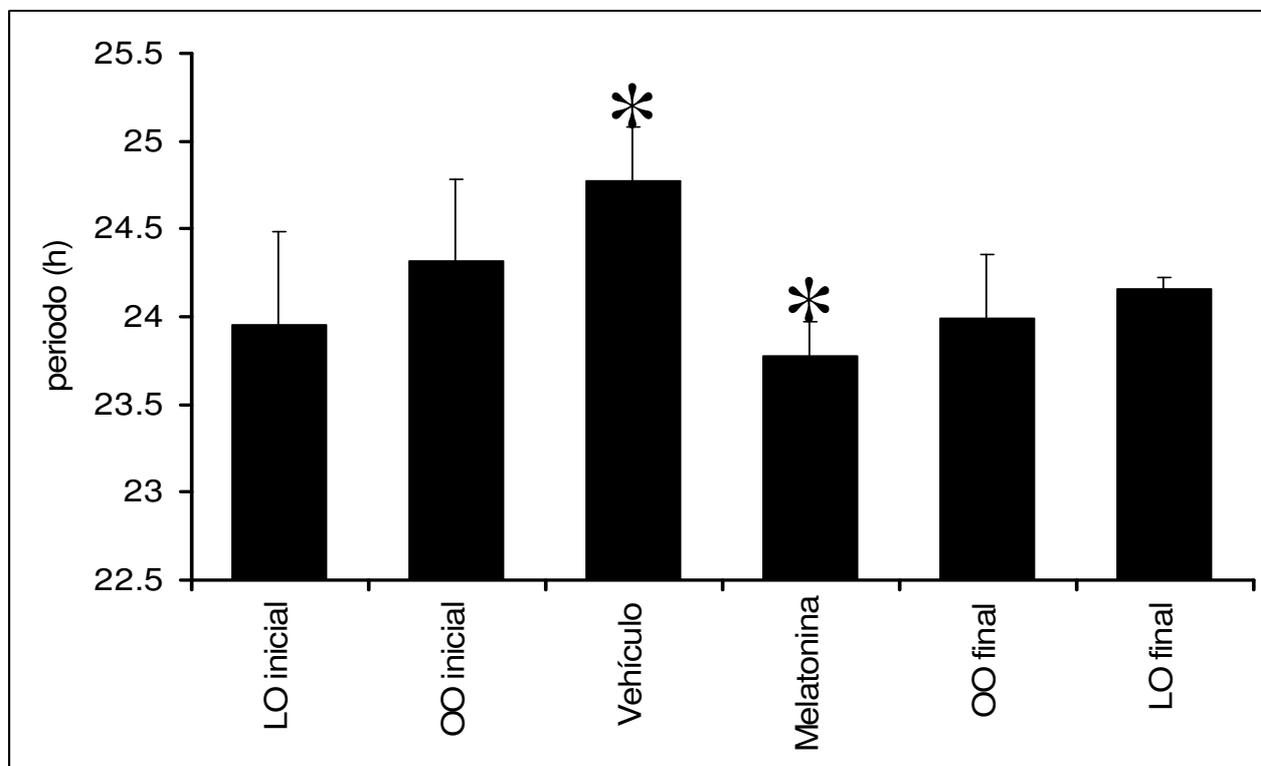


**Figura 7:** Periodogramas de cada una de las condiciones experimentales mostradas en el actograma anterior. Según la tabla 1 los datos corresponden a la lagartija situada en el canal n°6. En (a) LO del día 0 a 12; en (b) libre curso en oscuridad constante (días 13 a 23), en (c) inyección del vehículo durante (8) días, del 24 a 31; en (d) inyección de melatonina, durante 10 días, de los días 32 a 43; y en (e) el periodo en libre curso después de las inyecciones de melatonina. La línea diagonal en cada grafica indica el limite de significancia según el periodograma de  $\chi^2$ .

	Período según periodograma X <sup>2</sup> (hr)					
Nombre del Canal	LO inicial	OO inicial	Vehículo	Melatonina	OO final	LO final
lagamel1	21.53	23.81	23.89	22.93	23.67	23.65
lagamel2	24.12	24.91	25.81	23.89	24.18	EI
lagamel3	24.46	23.32	25.53	A	A	A
lagamel4	25.6	26.44	24.91	23.89	24.51	23.89
lagamel5	24.12	23.72	24.29	24.06	25.42	DI
lagamel6	23.89	23.72	24.23	24.12	23.05	DI
<b>Promedio</b>	23.953 h	24.320 h	24.777 h	23.778 h	23.988 h	24.16 h
<b>desv. est.</b>	1.334	1.168	0.771	0.485	0.909	0.170

**Tabla I:** Periodo individual en horas, obtenido de los análisis correspondientes de cada uno de los animales usados en este grupo en cada condición experimental. A significa que se presentó arritmia. DI, datos incompletos.

La figura 8 muestra el promedio de los periodos (promedio  $\pm$  error estándar). Tanto en la tabla I como en la figura 6, se observa que pese a la variabilidad en los periodos obtenidos en cada condición cuando se aplica la inyección de melatonina en comparación al vehículo hay una tendencia a recortar el periodo a valores cercanos a las 24 horas. Al aplicar una prueba estadística de T de student para variables dependientes, se obtiene que son significativas las diferencias entre los promedios de periodos obtenidos durante la inyección de vehículo y los obtenidos durante la inyección de melatonina ( $p=0.033$ , fig 8).



**Figura 8:** Gráfico que representa la diferencia de los periodos promedio en distintas condiciones experimentales. Los asteriscos indican las condiciones entre las cuales se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ , T Student).

	Valores de actividad neta en horas.					
Canal	LO inicial	OO inicial	Vehículo	Melatonina	OO final	LO final
lagamel1	8.06	11.07	12.52	13.23	NS	14
lagamel2	10.49	10.54	13.73	14.1	14.36	SD
lagamel3	14.48	9.06	9.05	SD	NS	NS
lagamel4	10.36	11.12	13.53	12.4	SD	14.47
lagamel5	8.43	8.8	8.8	9.06	7.17	SD
lagamel6	8	9.86	8.14	8.57	8.56	8.75
promedio	9.97	10.075	10.962	11.472	7.865	12.407
desv. est.	2.476	1.000	2.568	2.505	0.983	3.175
$\alpha/p$	$0.65 \pm 0.15$	$0.818 \pm 0.16$	$0.727 \pm 0.25$	$0.882 \pm 0.29$	$0.836 \pm 0.49$	0.59

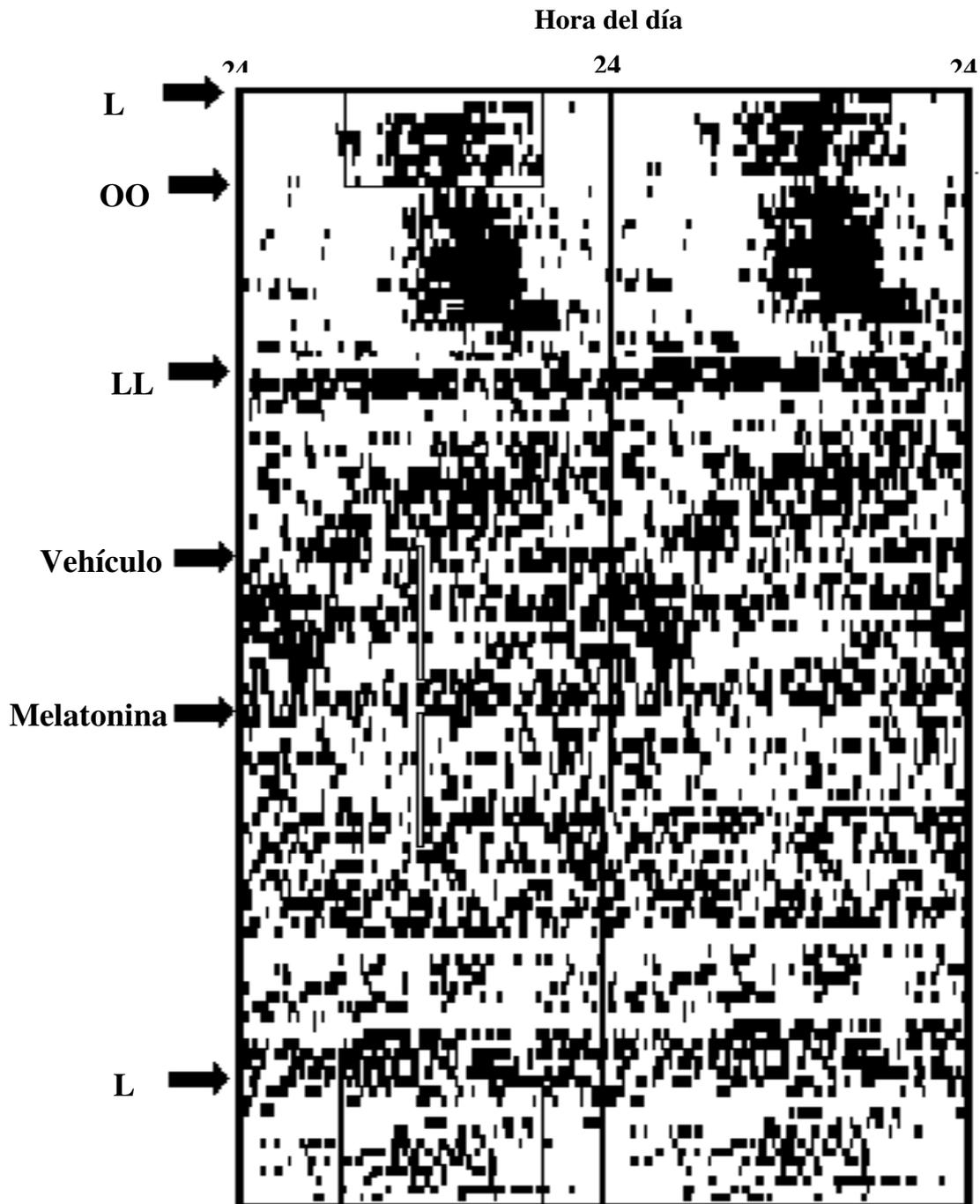
**Tabla II:** Valores de actividad neta e índice ( $\alpha/p$ ) de cada una de las condiciones medidas. Sin datos por falla del sistema de registro (SD). Arritmia y datos cualitativamente no útiles para la determinación de este parámetro (NS). No se obtuvieron diferencias significativas entre estos resultados.

Los parámetros de actividad y reposo también fueron analizados. Los resultados correspondientes se muestran en la tabla II. Existe una gran variabilidad interindividual en los valores netos de actividad pero en el promedio no son claras las diferencias entre los tratamientos. Para el caso de los datos de actividad neta del ciclo se puede ver que al inyectar la melatonina, en la mayoría de los casos, los animales se volvieron más activos, y esto se refleja también en la tendencia de los valores de  $\alpha/\rho$ , sin embargo, Ésta no muestra diferencias significativas. Al suspender la inyección de melatonina, en los dos casos donde se pudo obtener datos, se observa una disminución de la actividad neta. Es claro que la manipulación y la inyección del vehículo induce cambios en la intensidad de la actividad del animal.

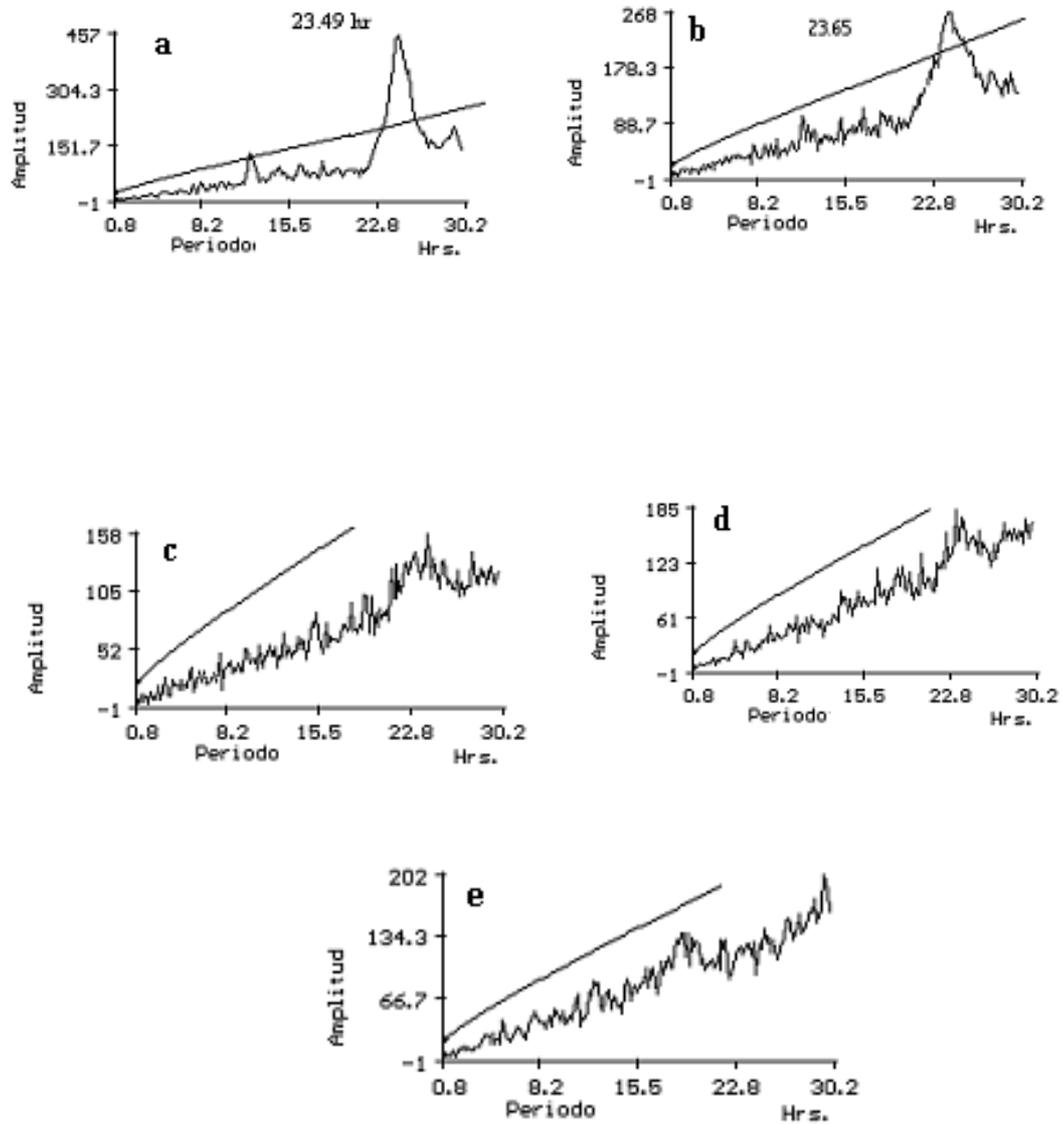
### **Grupo II: inyecciones periódicas de melatonina en animales arrítmicos**

Previo a la condición de luz constante, los animales mostraron sincronización y ritmo en libre curso semejante al observado en animales del grupo experimental anterior. Cuando inicia la condición de luz constante, la mayoría de los animales mostraron arritmicidad circadiana aproximadamente a los 3-6 días de iniciar la condición. En aquellos animales donde aun se observaba ritmicidad, la manipulación e inyección del vehículo cambiaron el periodo y los niveles de actividad, mientras que, ya arrítmicos, la inyección de melatonina no restituyó ritmicidad. La figura 9 muestra un actograma representativo de los datos obtenidos en este grupo. En condiciones de LO, la sincronización se presenta con un retraso de fase respecto al inicio del ciclo de luz, Al ser puesto en condiciones de oscuridad constante, se observa

claramente un ritmo en libre curso con periodo mayor a 24 horas. Después de 10 días de libre curso, el animal fue expuesto a condiciones de luz blanca constante (150 lx). Un acortamiento del periodo es observado inicialmente, sin embargo el periodo no es estadísticamente significativo según el actograma. Ni la administración del vehículo ni la de melatonina restituyen un ritmo circadiano de actividad con periodo significativo. Cuando el animal es sometido nuevamente a condiciones de LO, una incipiente ritmicidad es observada durante la fase diurna.



**Figura 9:** Acto grama que representa un ejemplo típico de lo que sucede al aplicar melatonina en animales arrítmicos. En este ejemplo ni el vehículo ni la melatonina restituyen ritmicidad. Las barras blancas verticales indican los días y hora en que se aplicó vehículo y melatonina respectivamente.



**Figura 10:** Periodogramas correspondientes al actograma de la figura 9. Es clara la baja amplitud en los valores de periodo observados durante la luz constante (LL), la aplicación del vehículo (V) y Melatonina (M).

canal	Periodo según periodograma X <sup>2</sup> (hr)					
	LO	LL inicial	Vehículo	Melatonina	LL final	LO final
8	24.14	24.95	22.08	A	A	23.81
7	23.49	23.65	24.46	A	A	A
6	23.81	24.57	24.3	A	A	24.46
D	24.14	A	A	A	A	25.97
E	25.14	A	A	A	A	NS
F	26.78	A	A	A	A	23.89
<b>promedio</b>	24.583	24.39	23.61	SD	SD	24.53
<b>desv. estándar</b>	1.210	0.668	1.330	SD	SD	1.001

**Tabla III:** Valores de los periodos obtenidos para cada una de las condiciones. A: representa los días donde se presentó arritmia. SD (sin datos) no se pudo obtener información por falta de datos.

En tres de los 6 animales usados en este experimento se pudo observar ritmos con periodo definido bajo las condiciones de LO inicial, LL inicial y vehículo. La variabilidad en los periodos observados indica que no hay correspondencia con lo esperado con la regla de Aschoff, con la cual se esperaba se acortara el periodo de actividad del animal (Corona Lagunas 2004). Después del periodo comprendido en la aplicación del vehículo estos animales presentaron arritmia circadiana en la actividad locomotora. Otros tres animales, presentaron indicaciones de arritmia desde los primeros días poco después de ser expuestos a la luz blanca brillante. Para el caso del canal 7,

con el vehículo el periodo aumenta de 23.65 h a 24.46 h, mientras que en el canal 8 disminuye de 24.95 h a 22.08 h. Ninguno de los animales mostró ritmo circadiano significativo durante los días en que se aplicó cíclicamente la melatonina, y solo dos de ellas no recuperaron ritmo en la condición de LO final.

CANAL	LOI	LL	LLV	LLM	LLF	LOF
<b>C6</b>	11.47	11	9.05	A	A	10.49
<b>C7</b>	10.66	8.4	13.3	A	A	A
<b>C8</b>	13.54	12.54	15.15	A	A	11.23
<b>CD</b>	11.59	A	A	A	A	12.27
<b>CE</b>	10.26	A	A	A	A	A
<b>CF</b>	11.06	A	A	A	A	A
<b>promedio</b>	11.43	10.7925	12.5	SD	SD	11.33
<b>Desv. est.</b>	1.1470	1.7332	3.1277	SD	SD	0.8942
<b><math>\alpha/p</math></b>	$0.999 \pm 0.167$	$0.732 \pm 0.42$	$0.53 \pm 0.12$	0	0	$0.64 \pm 0.127$

**Tabla 4:** valores de actividad, y promedio de  $\alpha/p$  presentada en cada condición. A significa arritmia. SD significa sin datos.

Se aplicó un análisis de varianza entre los grupos de LO inicial, LL y LL vehículo; luego una prueba de t-Bonferroni ( $p < 0.05$ ), y se determinó que existen diferencias significativas entre los grupos. La luz constante no acorta el periodo de actividad como se esperaría por la regla de Aschoff. Se puede ver en 2 de 3 casos que la actividad del animal aumenta bajo la condición de LL con vehículo.

## 11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

El sistema circadiano no es igual entre los vertebrados, principalmente por que los no mamíferos presentan múltiples fotorreceptores circadianos y distintos osciladores marcapasos en el sistema nervioso central. Los estudios de ritmos circadianos en lagartijas, han demostrado que la glándula pineal es un componente importante del sistema circadiano en reptiles y por ejemplo, el ritmo de la hormona que produce la pineal, la melatonina, puede ser observado in vitro (Tosini et al 2000). La pinealectomia puede tener efectos profundos en los ritmos de actividad expresados en condiciones constantes. Particularmente en las especies de *Sceloporus*, la pinealectomia produce arritmicidad en algunos animales, cambio de periodo y-o splitting (Underwood, H. 2001). Estos antecedentes indican que la glándula pineal y el ojo parietal son elementos que tendrían un papel marcapasos en el sistema circadiano de los reptiles y que pueden influir sobre el sistema que controla el ritmo de actividad localizado en algún otro sitio.

En algunos reptiles, las lesiones de la región homóloga al núcleo supraquiasmático pueden volver arrítmico al animal, indicando que posiblemente se encuentre aquí osciladores marcapasos. La influencia de la glándula pineal sobre el ritmo de actividad es presumiblemente a través de la melatonina. La melatonina se produce rítmicamente en la pineal con altos niveles durante la noche y bajos durante el día, la síntesis de la hormona melatonina es sensible a la luz, debido que la enzima de síntesis, la N-Acetil-Transferasa, se degrada en la luz; por lo tanto la luz constante abole la síntesis de melatonina en la glándula pineal.

Por otro lado la especie *Sceloporus torquatus*, usada en el presente estudio, presenta arritmia cuando es expuesta a condiciones constantes de luz (Corona-Lagunas 2004). Sin embargo cuando se pinealectomizan los animales, presentan únicamente el cambio de periodo señalado en otras especies de *Sceloporus* (Miranda -Anaya et al, 2006). Lo anterior nos indica que la pinealectomía no es equivalente al efecto que tiene la luz constante.

La ausencia de pineal reduce los niveles circulantes de melatonina (Tosini y Menaker 1998). La aplicación de melatonina a dosis suprafisiológicas y con distintos protocolos, ha demostrado que la melatonina tiene influencia sobre el periodo del ritmo y que en algunas lagartijas, también puede sincronizar el ritmo de actividad locomotriz (Hyde y Underwood, 2000).

En el presente trabajo pusimos a prueba la hipótesis de si en la lagartija *Sceloporus torquatus* la melatonina también logra sincronizar el ciclo circadiano de actividad locomotriz en ritmos en libre curso, y si la melatonina puede restituir la ritmicidad en animales arrítmicos en luz constante.

El primer objetivo nos permitió observar que al igual que otras especies estudiadas, la melatonina parece sincronizar a un ritmo en libre curso en oscuridad constante (figura 6) y que la relación de fase entre el pico de máxima actividad del ciclo circadiano, se conserva con el incremento de melatonina. Después de administrar las inyecciones de melatonina, el ritmo oscila libremente manteniendo una relación de fase estable desde el último día de sincronización, indicando que la sincronización fue efectiva.

Por otra parte, también pudimos observar que la manipulación y la inyección de la solución vehículo no sincroniza el ritmo de actividad: lo que fue fundamental para poder llevar a cabo los objetivos de este trabajo.

A una intensidad de 150 (Lx), el ritmo de actividad se pierde rápidamente y un patrón arrítmico se puede observar en los animales usados. Existen reportes en mamíferos que, cuando la arritmia se presenta en luz constante, existe un desacoplamiento entre las neuronas del núcleo Supraquiasmático del hipotálamo (Yamazaki y McMahon, 2005). Es posible que este efecto desacoplado se de también en los reptiles. Si por una parte la melatonina es capaz de causar cambios en el periodo del ritmo, en el presente trabajo exploramos la hipótesis de que también podría restituir la ritmicidad, ya sea como enmascaramiento mediado por la melatonina (Hyde y Underwood, 2000), o como un acoplador interno.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las dosis usadas de melatonina no permiten restituir la ritmicidad en luz constante, aunque si son suficientes para sincronizar el ritmo en condiciones de oscuridad constante. Esto indica que la melatonina puede, de alguna forma no conocida, cambiar la fuerza de acoplamiento entre distintos osciladores, y en consecuencia, tiene efecto en el periodo del ritmo manifiesto. La falta de restitución del ritmo circadiano en luz constante da lugar a nuevas preguntas como si distintas dosis de melatonina podrían ser empleadas para conocer si el umbral de sensibilidad a la melatonina es dosis dependiente en LL.

En oscuridad constante, *Sceloporus torquatus*, muestra una clara sincronización con melatonina. Este protocolo se desarrolló en los meses en

los que no se presenta crecimiento testicular y ovárico en la lagartija (febrero-abril); en esta época la concentración interna de melatonina suele ser menor en otras especies que en la época reproductiva (Bertolluci, 1998; Guillete & Méndez, 1993). El protocolo en luz constante se realizó entre los meses de mayo y julio, cuando se presenta crecimiento folicular; en esa época, la lagartija de ruinas (*Podarcis sicula*) presenta la concentración interna de melatonina mayor que en febrero (Bertolluci, 1998), pero no se presentó sincronización alguna.

A diferencia de otros trabajos realizados en lagartijas comunes (Foa, Bertolucci, 2003), donde la melatonina solo ejerce una influencia sincronizadora en verano, parece ser que en *S. torquatus* las concentraciones internas de melatonina producto del periodo del año en que se encuentren no afecta los resultados.

Trabajos de H. Underwood (1985, 1995) con *S. occidentalis* demuestran que la administración diaria de melatonina en cantidades suprafisiológicas puede sincronizar el ciclo de actividad locomotriz. En estos casos la melatonina se administra a las lagartijas por medio de implantes subcutáneos, donde se inyectó concentraciones de 0.2 y 0.3 mg de melatonina/ml. En otro protocolo utilizado por Underwood en 1984, se le hicieron inyecciones diarias de 10 µg de melatonina en 10 µl de agua destilada. En el presente trabajo con *S. Torquatus*, la melatonina se inyectó una vez al día, en una concentración de 3 µg de melatonina en 10 µl, y se observó una clara diferencia de horas en el inicio de actividad del animal entre el protocolo de Underwood (dos horas después de la inyección de melatonina)

y el protocolo realizado en el presente trabajo (ocho horas después de la inyección).

En los protocolos aplicados a *Anolis carolinensis* por Underwood y Hyde (1995, 2000), se pudo observar la sincronización en animales pinealectomizados, así como también arritmia y supresión de la actividad en el protocolo de luz constante.

En cambio, en el protocolo de luz constante de este trabajo no es posible restablecer el ciclo, probablemente se deba a la presencia de fotorreceptores extraoculares y marcapasos múltiples que responden a la luz; éstos de alguna forma están evitando que la melatonina en la concentración que fue inyectada, por si sola actúe como un sincronizador.

## **12. CONCLUSIONES.**

1. La melatonina puede actuar como un agente sincronizador que afecta directamente a los osciladores circadianos involucrados controlando la actividad locomotriz cuando tenemos condiciones constantes de oscuridad.
2. La concentración de melatonina inyectada en los protocolos influye directamente en el tiempo transcurrido entre la inyección y el inicio de actividad del animal.
3. La concentración de melatonina usada en este trabajo no es capaz de provocar una sincronización ni restauración del ciclo de actividad locomotriz cuando se presentan condiciones de pérdida del ciclo por de luz constante.

### 13. BIBLIOGRAFÍA.

- Aguilar Roblero Raúl (1993). Teorías Básicas de los Ritmos Biológicos. Psiquis nov/dic, Vol. 2, num. 6
- Aschoff Jürgen (1981). Handbook of Behavioral Neurobiology. Volume 4, Biological Rhythms. Plenum Press, New York.
- Barrett, R. K., & Takahashi, J. S. (1997). Lability of circadian pacemakers amplitude in chick pineal cells: A temperature-dependent process. Journal of Biological Rhythms, 12, 300-318.
- Bertolucci, C., & Foà A. (1998). Seasonality and role of SCN in entrainment of lizard circadian rhythms to daily melatonin injections. American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 274: 1004-1014.
- Bolliet, V., Bégay, V., Rervault, J., Ali, M., Collin, J., & Falcón, J. (1994). Multiple circadian oscillators in the photosensitive pike pineal gland: A study using organ and cell culture. Journal of Pineal Research, 16, 77-84.
- Cahill, G. M., & Bersharse, J. C. (1991). Resetting the circadian clock in *Xenopus eyercups*; regulation of retinal melatonin rhythm by light and D<sub>2</sub> dopamine receptors. Journal of neuroscience, 11, 2959-2971.
- Cassone, V. (1998). Melatonin's role in Vertebrate Circadian Rhythms. Chronobiology International, 15(5), 457-473.
- Corona Lagunas. (2004). Participación de la glándula pineal sobre la expresión del ritmo circadiano de actividad locomotora en la lagartija *Sceloporus torquatus*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 87 pp.

- Dubocovich, M., Krause, D., Jacob, S., Benloucif, S., & Masana, M. (1995). Localization and physiological role of melatonin receptors in the visual and circadian system. The Pineal Gland and Its Hormones. Edited by F. Fraschini et. al., Plenum Press, New York.
- Dunlap, Loros, & DeCoursey (2004) Cronobiology, Biological Timekeeping. Capítulo I. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, U.S.A. Pág. 1-24, 73-89.
- Feria Ortiz, M., Nieto-Montes de Oca, A., & Salgado Ugarte, I. (2001). Diet and Reproductive Biology of the Viviparous Lizard *Sceloporus torquatus* (Squamata: Phrynosomatidae). Journal of Herpetology, Vol. 35, N° 1, pp 104-112.
- Foà, A., & Bertolucci, C. (2003). Toward a seasonal model of the circadian system: the case of ruin lizards. Frontiers in Biosciences 8, s236-242. Mayo 1.
- Foster R y Menaker M. (1995). Circadian Photoreception in Mammals and Other Vertebrates. Edited by L.Wetterberg, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. Pergamon Press. New York.
- Foster, R., garcía-Fernández, J., Provencio, I., & DeGrip, W. (1993). Opsin localization and chromophore retinoids identified within the basal brain of the lizard *Anolis carolinensis*. Journal of Comparative Physiology A, 172, 33-45.
- Foster, R., Grace, M., orivencio, I., DeGrip, W., & Gracia-Fernández, J. (1994). Identifiacion of vertebrate deep brain photoreceptors. Neurosciences and Biobehavioral Reviews, 18, 541-546.
- Gaston & Menaker, M. (1968). M. Pineal Function: The biological clock in the sparrow. Science 160: 1125-1127..

- Golombek Diego A. (1997). Cronobiología: en busca del tiempo perdido. Fisiología de los ritmos biológicos. Apuntes del II curso latinoamericano de Cronobiología, Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F.
- Grace, M., S.; Alones, V., Menaker, M., & Foster, R. (1996). Ligth perception in the vertebrate brain: An ultrastuctural analysis of opsin-and vasoactive intestinal polypeptide-inmunoreactive neurons in iguanid lizards. Journal of Comparative Neurology, 367, 575-594.
- Gruart, A., Delgado, J.M., Escobar, C., & Aguilar Robledo, R. (2002). Los Relojes que Gobiernan la Vida. La Ciencia para todos nº 188. fondo de Cultura Económica, México D.F.
- Guillete, L, & Méndez de la Cruz. (1993). The reproductive cycle of the viviparous Mexican lizard *Sceloporus torquatus*. Journal of herpetology. 2 (27): 168-174.
- Halberg, F. (1959). Physiologic 24-hour periodicity; General an Procedural considerations with reference of the adrenal cycle. Zeitschrift für Vitamin-, Hormon und Fermentforschung. Sonderdruck aus Band X, Helf ¾.
- Halberg, F., Cornélissen, G., Katinas, G., Syutkina, E., Sothern, R., Zaslavskaya, R., Halberg Francine, Watanabe, Y., Schwartzkopff, O., Otsuka, K., Tarquini, R., Frederico, P., & Siggelova, J. (2003). Transdisciplinary unifying implications on circadian findings in the 1950´s. Journal of Circadian Rhythms, October, 1:2 (61 páginas).
- Hardin, Paul E.. (2000). From biological clock to biological rhythms. Genome biology 1 (4) 10231-10235.
- Hidenobu Otha, Shin Yamazaki & Douglas G Mc Mahon. (2005). Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. Nature Neuroscience, volume 8 enero 2005.

- Hyde, L., & Underwood, H. (1985). Daily melatonin infusions entrain the locomotor activity of pinealectomized lizards.
- Hyde, L., & Underwood, H. (2000). Effects of melatonin administration on the circadian activity rhythm of the lizard *Anolis carolinensis*. *Physiology & Behavior* 71-183, 1992.
- Janik, D., Cassone, V. M., Pickard, G. E., & Menaker, M. (1994). Retinohypothalamic projections and immunocytochemical analysis of the suprachiasmatic region of the desert iguana *Dipsosaurus dorsalis*. *Cell and Tissue Research*, 275, 399-406.
- Menaker M. (1997). Commentary: What Does Melatonin Do and How Does It Do It? *Journal of biological rhythms*. Vol. 12 N° 6, December.
- Menaker, M., Moreira, L.F., & Tosini, G. (1997). Evolution of circadian organization in vertebrates. *Brazilian Journal of medical and biological research*, 30: 305-313.
- Miranda Anaya, M., Bartell, P., & Menaker, M.. (2002). Circadian Rythm of Iguana Electroretinogram: The Role of Dopamine and Melatonin. *Journal of Biological Rythms*, vol. 17 N° 6, December 2002, 526-538.
- Miranda Anaya, M., Corona-Lagunas, J., & Bartell, P. (2006). Seasonal effects of pinealectomy on the locomotor activity rhythm in the lizard *Sceloporus torquatus*. *Biological Rhythm Research*, 2006;1-7, Preview article.
- Pévet, Pitrosky, Masson-Pévet, Kirsch, Canguilhem, & Vivien-Roels. (1995). Physiological effects and biological activity of melatonin. *The pineal gland and its hormones.* Edited by F. Fraschini et. all. Plenum Press, New York. Ralph C. L. (1981). Melatonina production by extrapineal tissue. In N.Birau & W. Chloot

- (editores), Melatonin- Current status and perspectives (pp, 35-46). New York; Pergamon Press.
- Pohl, H. (2000). Circadian control of migratory restlessness and the effects of exogenous melatonin in the brambling, *fringilla montifringilla* *Chronobiology International*, 17 (4), 471-488.
- Reiter, R. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49: 654-664.
- Shiu, S. Y, Yu, Z. H., Chow, P. H., & Pang, S. F. (1996). Putative Melatonin Receptors in the Male Reproductive Tissues. Publicado en: Tang PL, Pang S. Reiter RJ (eds): *Melatonin: A Universal Photoperiodic Signal with Diverse Actions*. Front Horm Res. Basel, Karger, Vol. 21, pp 90-100.
- Strogartz, S., & Stewart, I. (1993). Coupled Oscillators and Biological Synchronization. *Scientific American*, December 102-108.
- Takahashi, J. S, Murakami, N., Nikaido, S. S., Pratt, B., & Robertson, L., M. (1989). The avian pineal, a vertebrate model system of the circadian oscillator: Cellular regulation of circadian rhythm by light, second messengers, and macromolecular synthesis. *Recent Progress in Hormone Research*, 45, 279-352.
- Takahashi, J. S., & Menaker, M. (1984). Multiple redundant circadian oscillators within the isolated avian pineal gland. *Journal of Comparative Physiology A*, 154, 435-440.
- Underwood, H. (1983). Circadian pacemakers in lizards: phase response curves and effects of pinealectomy. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 244: 857-864.

- Underwood, H. (1989). The pineal and melatonin: Regulators of circadian function in lower vertebrates. *Experientia* 45: 914-921.
- Underwood, H. (2001) Circadian Organization in Nonmammalian Vertebrates. Circadian Clocks, Volume 12 of *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Plenum Publishers, New York. Pp 111-140,
- Underwood, H., & Harless, M. (1985). Entrainment of the circadian activity rhythm of a lizard to melatonin injections. *Physiology & Behavior*, vol. 35, pp 267-270. *Physiology & Behavior*, vol. 35, pp 267-270.
- Underwood, H., & Calaban, M. (1987). Pineal Melatonin Rhythms in the lizard *anolis carolinensis*: I. Response to light and temperature cycles. *Journal of Biological Rhythms*, vol. 2, No. 3, pp 179-193.
- Underwood, H., & Calaban, M. (1987). Pineal Melatonin Rhythms in the lizard *anolis carolinensis*: II. Photoreceptive Inputs. *Journal of Biological Rhythms*, vol. 2, No. 3, pp 195-206.
- Uribe-Peña, Z., Ramírez, A., & Casas, G. (1999). Anfibios y Reptiles de las Serranías del Distrito Federal, México. Cuadernos 32. Instituto de Biología, UNAM.
- Vega Arturo. (1993). Análisis estadístico en Cronobiología. *Psiquis*, Vol.2, núm. 6.
- Zimmerman, N. H., & Menaker, M. (1979). The pineal gland: A pacemaker within the circadian system of the house sparrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76, 999-1003.