



**Universitat**  
de les Illes Balears

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

# **RITMO CIRCADIANO DE ACTIVIDAD-REPOSO DEL RAOR (*Xyrichtys novacula*) EN SU HÁBITAT NATURAL, ANTES Y DURANTE SU PERIODO DE REPRODUCCIÓN**

**José Manuel Pujol Rodríguez**

**Grado de Biología**

**Facultad de Ciencias**

**Año Académico 2020-21**

# RITMO CIRCADIANO DE ACTIVIDAD-REPOSO DEL RAOR (*Xyrichtys novacula*) EN SU HÁBITAT NATURAL, ANTES Y DURANTE SU PERIODO DE REPRODUCCIÓN

**José Manuel Pujol Rodríguez**

**Trabajo de Fin de Grado**

**Facultad de Ciencias**

**Universidad de las Illes Balears**

**Año Académico 2020-21**

Palabras clave del trabajo:

*Xyrichtys novacula*, Ritmo circadiano actividad-reposo, Telemetría acústica, Reproducción.

*Nombre Tutor/Tutora del Trabajo: Mourad Akaarir El Ghourri*

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## RESUMEN

La periodicidad cíclica inherente al entorno físico ha funcionado a lo largo de la evolución como un motor seleccionador de los seres vivos. Los diferentes organismos adaptados a este entorno cambiante han desarrollado procesos fisiológicos que varían cíclicamente, los denominados ritmos biológicos. Que, aunque persisten independientemente del entorno, estas variaciones cíclicas ambientales son capaces de sincronizarlos. Entre los ritmos biológicos más importantes de los animales, encontramos los ritmos circadianos, cuyo periodo es aproximado a 24 h, y en los cuales cobran gran importancia los osciladores o relojes circadianos, estructuras capaces de inducir y regular de manera innata estas respuestas fisiológicas cíclicas. En los peces Teleósteos, encontramos multitud de estos osciladores, pero el órgano pineal es el más importante, al presentar la capacidad de detectar por sí mismo la variación ambiental de luz-oscuridad, y regular de manera endógena la síntesis de melatonina y el ritmo circadiano de actividad-reposo de los peces. En el presente trabajo, se define el ritmo circadiano actividad-reposo del Raor (*Xyrichtys novacula*), un pequeño pez Teleósteo de gran importancia en Baleares, en su propio hábitat, antes y durante el periodo de la reproducción. Se utilizan parte de los datos recogidos durante el proyecto de investigación CLOCKS, donde mediante telemetría acústica se detecta la actividad de los peces, entendida como su desplazamiento, en intervalos de un minuto. Con estos datos se define el ritmo circadiano de actividad-reposo de estos peces mediante sus valores no paramétricos (IV, IS, RA, M10 y L5) y se observa un ritmo bien marcado, poco fragmentado y bien sincronizado con el ciclo ambiental de luz-oscuridad, independientemente del sexo y la época estudiada. Sin embargo, durante la reproducción el ritmo se ve ligeramente más desincronizado y fragmentado, causado por las variaciones del fotoperiodo. Además, en ambos periodos la actividad de los machos es muy superior a las hembras, posiblemente debido al comportamiento peculiar de los machos a la hora de defender los harenes que ellos lideran.

## ABSTRACT

The cyclic periodicity inherent in the physical environment has functioned throughout evolution as a driving force for the selection of living organisms. The different organisms adapted to this changing environment have developed physiological processes that vary cyclically, the so-called biological rhythms. Although they persist independently of the environment, these cyclical environmental variations are able to synchronize them. Among the most important biological rhythms of animals, we find the circadian rhythms, whose period is approximately 24 h, and in which the oscillators or circadian clocks, structures capable of inducing and regulating innately these cyclical physiological responses, are of great importance. In teleost fish, we find a multitude of these oscillators, but the pineal organ is the most important, as it has the capacity to detect by itself the environmental variation of light-darkness, and to regulate endogenously the synthesis of melatonin and the circadian rhythm of activity-rest of the fish. In the present work, we define the circadian activity-rest rhythm of the Raor (*Xyrichtys novacula*), a small teleost fish of great importance in the Balearic Islands, in its own habitat, before and during the breeding period. Part of the data collected during the CLOCKS research project is used, where acoustic telemetry is used to detect the activity of the fish, understood as its movement, in one-minute intervals. With these data, the circadian rhythm of activity-rest of these fish is defined by its non-parametric values (IV, IS, RA, M10 and L5) and a well-marked rhythm is observed, little fragmented and well synchronized with the environmental light-dark cycle, independently of the sex and the time of year studied. However, during reproduction the rhythm is slightly more desynchronized and fragmented, caused by variations in the photoperiod. Moreover, in both periods the activity of males is much higher than that of females, possibly due to the peculiar behavior of males when defending the harems they lead.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	6
1.1. Cronobiología. Ritmos biológicos.....	6
1.2. Sistema circadiano.....	7
1.2.1. Sistema circadiano en peces .....	8
1.3. Ritmo actividad-reposo .....	11
1.3.1. Ritmo actividad-reposo en peces.....	13
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	13
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	14
3.1. <i>Xyrichtys novacula</i> , etiquetado de los peces con los micro-transmisores JSATS .....	14
3.2. Lugar y condiciones de estudio .....	15
3.3. Monitoreo de la actividad de los peces.....	15
3.4. Análisis de los datos .....	16
3.4.1. Análisis visual .....	16
3.4.2. Análisis no paramétrico del Ritmo circadiano de actividad-inactividad .....	17
3.4.3. Análisis de la actividad.....	18
3.4.4. Análisis estadísticos .....	18
<b>4. RESULTADOS</b> .....	19
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	25
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	27
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	28

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mis compañeros, especialmente a Manuel Ruiz y Esperanza Rojas, por todo el apoyo y ayuda que me han ofrecido durante el desarrollo de este trabajo. Además, quiero agradecer al Dr. Mourad Akaarir El Ghourri, como tutor, y en muchas ocasiones como un compañero más, por darme las directrices y ayuda necesarias para el correcto desarrollo de este TFG.

También quisiera agradecer a todos los investigadores involucrados en el desarrollo del proyecto CLOCKS, sin su labor científica, nunca hubiera conseguido los datos necesarios para la elaboración de este estudio.

Finalmente dar las gracias a mi familia, por haberme dado la oportunidad de haber cursado este maravilloso grado universitario y haberme aguantado durante estos cuatro largos años.

## ABREVIATURAS

- MESOR: Estadística de estimación del ritmo en la línea.
- SNC: Sistema nervioso central.
- NSQ: Núcleo supraquiasmático.
- GP: Glándula pineal.
- OP: Órgano pineal.
- EEG: Encefalograma.
- REM: Movimientos oculares rápidos.
- NREM: No movimientos oculares rápidos.
- IV: Variabilidad Intradía.
- IS: Estabilidad entre Días.
- RA: Amplitud Relativa.

# 1. INTRODUCCIÓN

La fisiología y el comportamiento de los seres vivos están sometidos a una periodicidad cíclica inherente al entorno físico que habitan, causada por los propios movimientos de la Tierra. Estos son los movimientos rotacionales, que dan como resultado el ciclo día-noche (variaciones de luz y temperatura), y los movimientos traslacionales, manifestando la aparición de las estaciones. La adaptación de los seres vivos a esta periodicidad intrínseca del entorno que residen se ponen en manifiesto con el desarrollo ritmos endógenos, los denominados ritmos biológico, que son estudiados por la cronobiología (Aschoff, 1965; Postolache & Raheja, 2016; Roenneberg et al., 2003).

## 1.1. Cronobiología. Ritmos biológicos

La cronobiología (del griego *kronos* = tiempo, *bios* = vida, y *logos* = ciencia) es aquella rama de la ciencia que estudia los diferentes cambios rítmicos (ritmos biológicos) presentes en la fisiología de los diferentes seres vivos y su adaptación a las variaciones cíclicas del ambiente (lumínicas, térmicas...) (Halberg, 1969; Madrid & Rol de Lama, 2015). A su vez, los ritmos biológicos se definen como aquellas repeticiones cíclicas, producidas en intervalos regulares de tiempo, de un comportamiento o fenómeno fisiológico presente en los diferentes organismos como adaptación al medio cambiante (Madrid & Rol de Lama, 2015). Además, una de las principales propiedades de estos ritmos es su carácter endógeno, ya que persisten bajo condiciones ambientales constante, entrando en un estado de curso libre (Aschoff & Wever, 1981).

Los ritmos biológicos se clasifican según el periodo, tiempo en el que se completa un ciclo, y su frecuencia (inversa del periodo), entendida como el número de repeticiones del ciclo por unidad de tiempo. Se toma el día (24 h) como tiempo de referencia, clasificando los ritmos en Ultradianos, cuando la frecuencia es superior al día (< 20 h), por ejemplo, la ventilación pulmonar; Circadianos, cuando la frecuencia es aproximadamente de un día (20-28 h), como el ritmo actividad-inactividad; e Infradianos, cuando la frecuencia es inferior al día (>28 h), y en los que encontramos los ritmos circalunares (de unos 28 días), circanuales (365 días) y circaseptanos (7 años) (Halberg, 1969; Madrid & Rol de Lama, 2015).

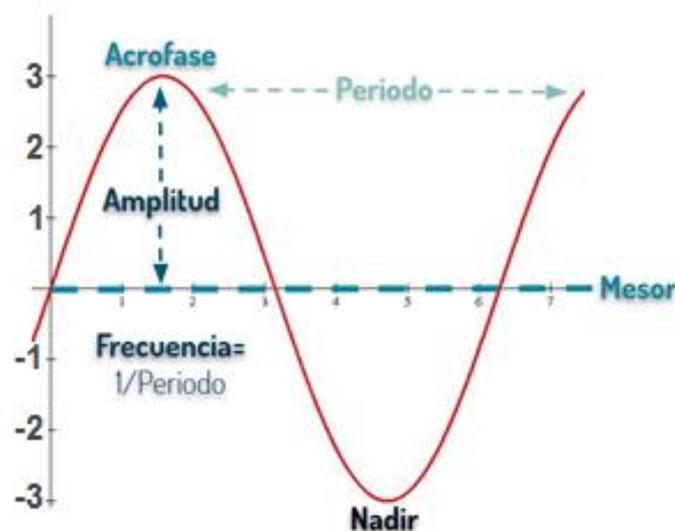


Fig. 1: Esquema de los parámetros que definen un ritmo biológico, cuando los valores de este se ajustan a una función coseno.

Además, los ritmos biológicos, y sobre todo los circadianos, suelen ajustarse a una función coseno formando una onda sinusoidal, cuyos parámetros definen al ritmo (Fig. 1) (Halberg, 1969; Madrid & Rol de Lama, 2015). Entre los parámetros que definen al ritmo, encontramos la Frecuencia que es, como ya se ha comentado, el número de repeticiones del ciclo por unidad de tiempo; también encontramos el Periodo, que es el tiempo que tarda en completarse un ciclo del ritmo; MESOR (Midline Estimating Statistic of Rhythm) que es el valor intermedio de los diferentes valores por los que oscila el ritmo; la Acrofase o Zénit es el momento en el que se alcanza el valor máximo de entre todos los valores por los cuales oscila el ritmo (lo contrario es el Nadir); y finalmente la Amplitud es la diferencia que hay entre el MESOR y el valor que se alcanza en la Acrofase (Madrid & Rol de Lama, 2015).

## 1.2. Sistema circadiano

A lo largo de la evolución, la selección natural ha permitido que muchos organismos desarrollen estructuras relacionadas con el denominado sistema circadiano. Permitiendo así establecer y sincronizar respuestas fisiológicas en periodos aproximados a 24 horas, aumentando así la supervivencia de estas especies. Principalmente, son dos las ventajas que proporciona este sistema a la supervivencia de los animales, una es la anticipación a cambios predecibles y periódicos del ambiente, y la otra es la separación temporal de procesos fisiológicos antagónicos (Madrid & Rol de Lama, 2015).

De manera muy general el sistema circadiano está compuesto por 3 componentes principales, los sincronizadores ambientales o “zeitgeber” (palabra alemana que significa dador de tiempo), el reloj circadiano u oscilador, y los propios ritmos biológicos (Fig. 2) (Golombek & Yanicelli, 2006). Además, tienen aún más importancia las relaciones entre ellos, como pueden ser, la sincronización entre el “zeitgeber” y el oscilador, producida gracias a las vías de entrada; el acoplamiento entre el oscilador y los ritmos biológicos, mediante las vías de salida; el cierto enmascaramiento entre el sincronizador y el ritmo; y la retroalimentación del ritmo al oscilador (Fig. 2) (Golombek & Yanicelli, 2006; Madrid & Rol de Lama, 2015).

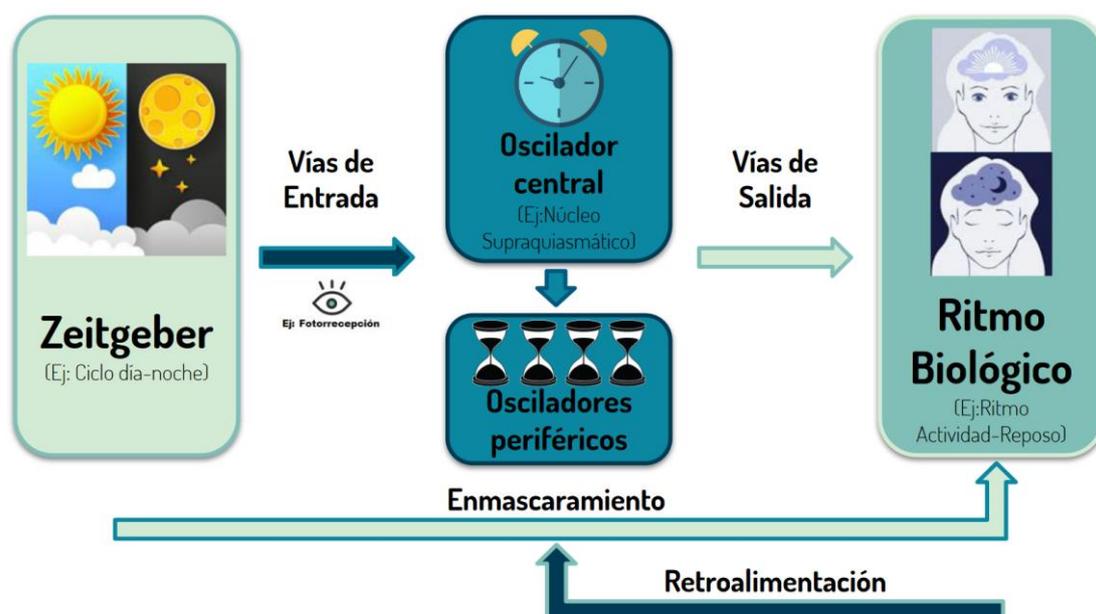


Fig. 2: Esquema general de los componentes que forman el Sistema Circadiano.

Cada una de las células que forman un organismo tienen una cierta presencia intrínseca de mecanismos de reloj, sin embargo, suelen manifestarlo frente a un estímulo externo o interno. Por otro lado, aparecen estructuras capaces de inducir de manera innata estas respuestas fisiológicas cíclicas (mecanismos de reloj) independientemente de la estimulación. Son los denominados osciladores o relojes centrales, que suelen encontrarse a nivel de sistema nervioso central (SNC) (Zhdanova & Reeb, 2005). Por lo que, se podría definir como oscilador central, a aquella estructura capaz de regular de manera intrínseca una respuesta fisiológica temporizada autosustentada, cuyo período es específico del oscilador (Golombek & Yanicelli, 2006). Además del reloj central, también intervienen numerosos osciladores periféricos bajo el control del reloj central, que pueden estar localizados también a nivel de SNC o en estructuras y órganos periféricos; y es la interacción entre ellos la que desencadena/induce el ritmo biológico (Madrid & Rol de Lama, 2015). El oscilador central más conocido es el Núcleo Supraquiasmático (NSQ) localizado en el Hipotálamo de los mamíferos por encima del Quiasma Óptico; en el resto de vertebrados, este oscilador central varía (Golombek & Yanicelli, 2006).

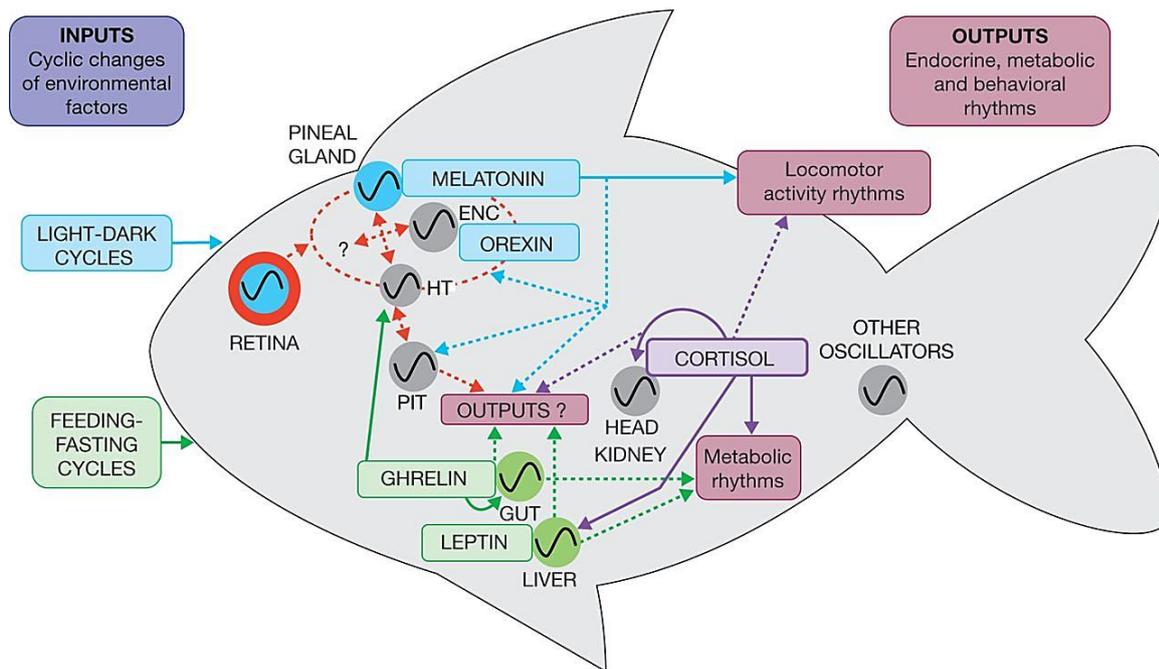
Los ritmos biológicos, en ausencia de componentes externos, se ajustan al período marcado por el reloj central, que en el caso de los circadianos suele oscilar las 24 horas, pero sin serlo exactamente (Zhdanova & Reeb, 2005). Al no coincidir exactamente con las horas que forman un día, se producirá un adelantamiento o retraso en la aparición del ritmo según pasen los días (Golombek & Yanicelli, 2006), a este tipo ritmos se les denominan como ritmos en curso libre (Aschoff & Wever, 1981). Es aquí donde cobra importancia el papel de los “zeitgeber” o sincronizadores ambientales, que son componentes externos (normalmente ambientales) que, mediante las vías de entrada, sincronizan (“ponen en hora”) el reloj central con los ciclos ambientales (Golombek & Yanicelli, 2006; Madrid & Rol de Lama, 2015; Zhdanova & Reeb, 2005). El sincronizador más importante es la luz, capaz de ajustar los ritmos biológicos con el ciclo luz-oscuridad que se produce cada día. En adición, existen otros componentes ambientales que funcionan como sincronizadores, como pueden ser la temperatura, el riesgo de depredación, la disponibilidad de alimentos... (Isorna et al., 2017; Zhdanova & Reeb, 2005).

La hormona melatonina es el principal mediador, y el más caracterizado en vertebrados, en la relación entre el reloj central, los periféricos y la manifestación del ritmo circadiano; formando una parte muy importante de las vías de salida del sistema circadiano (Madrid & Rol de Lama, 2015; Zhdanova & Reeb, 2005).

### 1.2.1. Sistema circadiano en peces

El sistema circadiano en peces está compuesto por gran multitud de osciladores localizados en la mayoría de sus tejidos (Fig. 3). Además, el funcionamiento molecular de estos no suele diferir, haciendo difícil distinguir entre los osciladores centrales y los periféricos (Isorna et al., 2017). Se basan en bucles de retroalimentación traslacional-transcripcional de un conjunto de genes, los Genes CLOCK. Debido a estos bucles, la expresión de sus respectivos ARNm y los niveles de proteína oscilan durante períodos de aproximadamente 24 h, apareciendo así la característica ritmicidad de estos, que a su vez son sincronizados por las señales temporales externas (por ejemplo, el ciclo luz-oscuridad) (Zhdanova & Reeb, 2005).

La jerarquía en los osciladores de los peces no es tan visible como en los mamíferos, donde el NSQ funciona como reloj maestro capaz de sincronizar y regular el resto de osciladores. En los peces este reloj central no ha sido identificado y se ha observado que los osciladores ubicados en tejidos periféricos presentan un adelantamiento o están en fase respecto a los más centrales, lo que indicaría una sincronización independiente por oscilador (Isorna et al., 2017). Sin embargo, la Glándula/Órgano Pineal es clave en su sistema circadiano de los peces y muchos autores lo consideran como reloj maestro en la mayoría de Teleosteos (Saha et al., 2019).

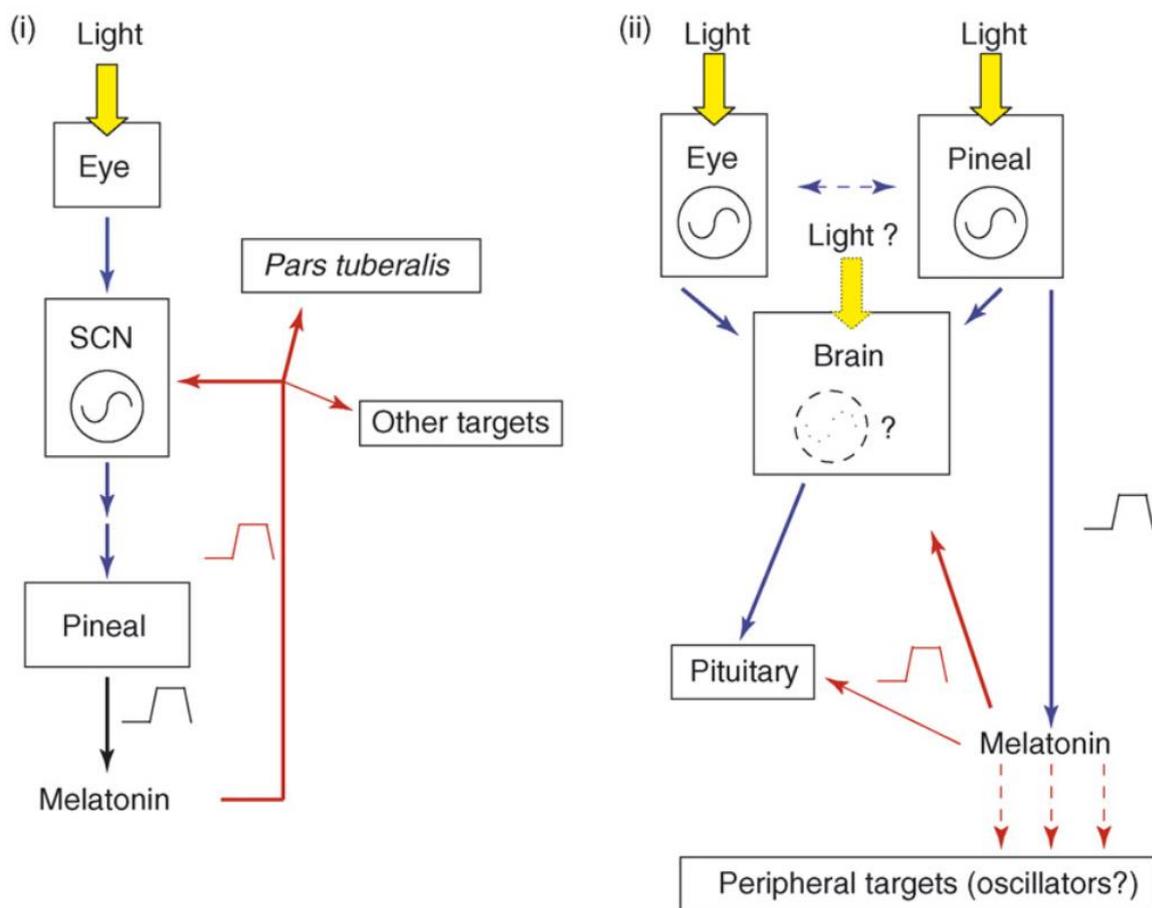


**Fig. 3:** Sistema Circadiano en peces: Compuesto por múltiples osciladores localizados a lo largo del organismo, que se sincronizan mediante los Zeitgeber (ciclos de luz-oscuridad y alimentación-ayuno), generando salidas (ritmos biológicos) como son la actividad locomotora y los ritmos metabólicos. Sistema circadiano del ritmo reposo-actividad representado en azul, sistema circadiano de los ritmos metabólicos representado en verde, morado interacción entre ambos. Este diagrama sólo muestra osciladores más estudiados. Las líneas continuas indican las conexiones que se conocen actualmente en los peces, mientras que las líneas discontinuas ilustran las conexiones hipotéticas de las que aún no se ha informado. ENC, otros núcleos encefálicos; HT, hipotálamo; PIT, glándula pituitaria. (Isorna et al., 2017).

La Glándula Pineal (GP) en los mamíferos, Órgano Pineal (OP) en el resto de vertebrados, se trata de una estructura neuroendocrina capaz de sintetizar y secretar de manera rítmica y dependiente de la luz para sincronizarse, la hormona melatonina (Zhdanova & Reeb, 2005). A diferencia de los mamíferos, que la GP (formada por células llamadas pinealocitos) actúa de manera únicamente endocrina al carecer de fotorreceptores, en el resto de vertebrados, y concretamente en los Teleosteos, el OP posee la doble función de fotorreceptor y de tejido endocrino.

Por lo que, en el caso de la GP de los mamíferos, la información de la luz/oscuridad se recibe a través de la vía adrenérgica retina (fotorreceptor)-NSQ (oscilador central)-ganglio cervical superior-nervio coronario; y en el caso del OP de los peces, la propia información lumínica es captada por los pigmentos fotosensible (por ejemplo, la melanopsina) que poseen sus propias células fotorreceptoras similares a los conos de la retina (Fig. 4), mediante una pequeña “ventana transparente/tercer ojo” en la parte superior del cráneo (Fig. 5) (Saha et al., 2019). Esto implica que, en los peces Teleosteos, el propio OP posee las tres propiedades características de los sistemas circadianos dependiente de luz, la capacidad de fotodetección, el oscilador y la maquinaria de síntesis de melatonina, generando así el ritmo en su fabricación y secreción (Zhdanova & Reeb, 2005).

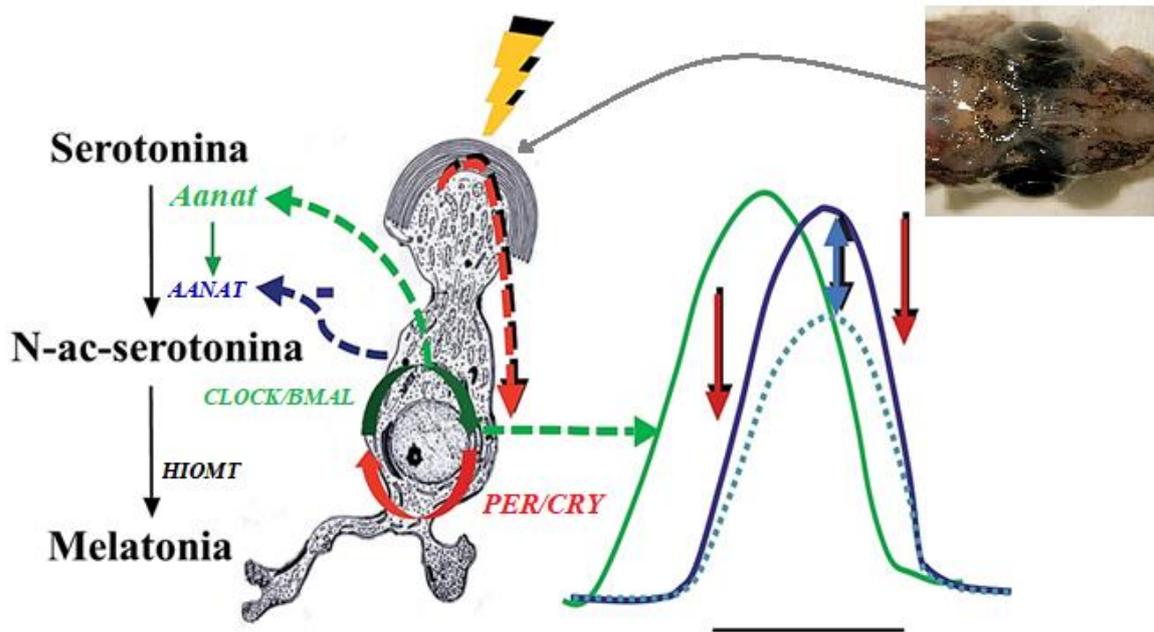
La melatonina cumple un papel muy importante a la hora de actuar como señalizador químico capaz de mediar entre la información lumínica captada y la sincronización con los ritmos endógenos y otros osciladores periféricos (Fig. 4) (Falcón et al., 2011; Saha et al., 2019). Además del OP, en los peces Teleosteos, existen otras estructuras que funcionan como osciladores, que son capaces de sintetizarla también. En la retina, el ciclo de luz-oscuridad es captado por los conos y bastones, además de otras células retinales como pueden ser las células nucleares y ganglionares de la capa interna de la retina, regulando el ritmo de síntesis de la melatonina; que en este caso actúa de manera local para anticiparse a los cambios de luz (Zhdanova & Reeb, 2005).



**Fig. 4:** Representación esquemática de la vía de regulación fótica de la síntesis de melatonina en (ii) peces y (i) mamíferos. (Falcón et al., 2007).

A partir del ciclo día-noche, la luz es capaz de sincronizar el reloj molecular interno, tanto del OP como de la retina, regulando así los niveles de síntesis de melatonina a partir de la regulación en la expresión del gen *aanat* (Fig. 5). Este gen lleva incorporado la información para la síntesis del enzima arilalquilamina n-acetiltransferasa (aanaT), la penúltima enzima en la vía de biosíntesis de la melatonina (Fig. 6). Son tres, los genes *aanat* conocidos en peces, el gen *aanat2* exclusivo del OP, además de *aanat1a* y *aanat1b*, expresados en la retina y otros tejidos periféricos (Falcón et al., 2011; Saha et al., 2019; Zhdanova & Reeb, 2005).

De esta forma, en la mayoría de peces, la síntesis de melatonina aumentaría durante la fase nocturna del ciclo luz-oscuridad, y se inhibiría durante el día (Fig. 5). Generándose así un ritmo sincronizado en las concentraciones plasmáticas de esta hormona, lo que proporcionaría una señal circadiana al resto del organismo, e intervendría en procesos fisiológicos como la reproducción, la actividad motora, el sueño, la alimentación... Por lo que, en conclusión, para que se produzca la aparición de los ritmos circadianos en peces es fundamental la melatonina y los órganos o estructuras que la regulan y sintetizan (Saha et al., 2019; Zhdanova & Reeb, 2005).



**Fig. 5:** Ejemplo de la “ventana” pineal de los peces. En este caso la foto proviene de la una especie de tilapia (*Oreochromis mossambicus*). (Falcón et al., 2011). Y esquema del control de la síntesis de melatonina por una célula fotorreceptora del OP. (Adaptación de Falcón et al., 2011).

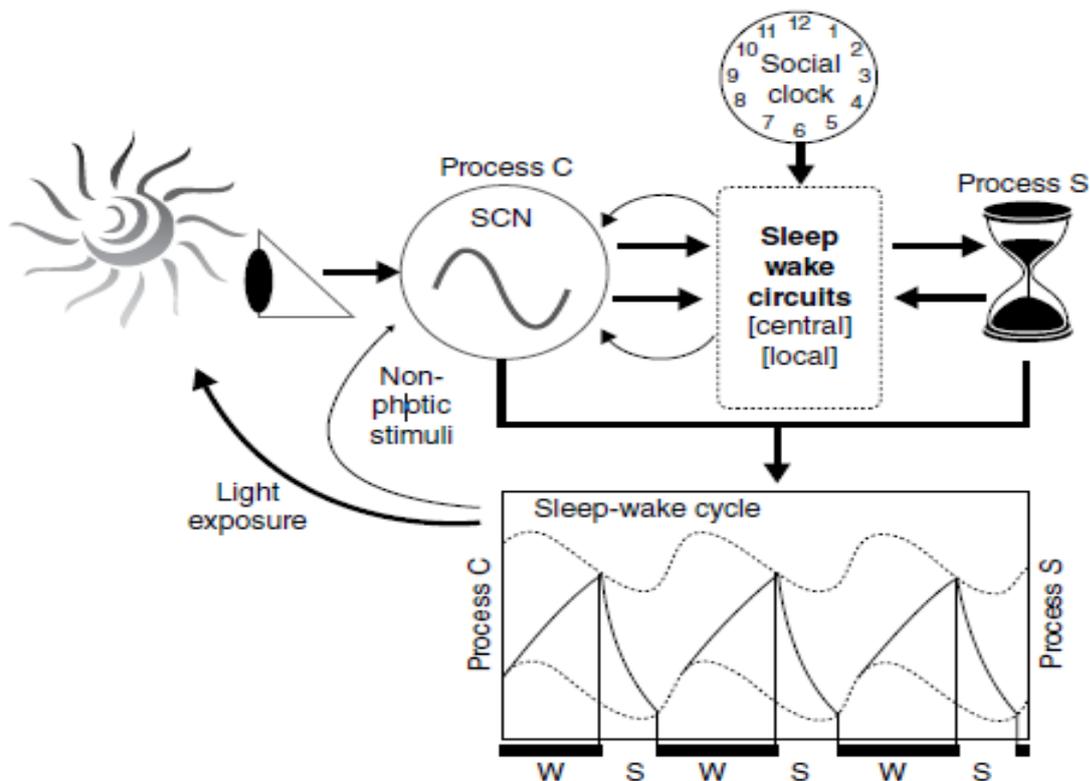
### 1.3. Ritmo actividad-reposo

El ritmo circadiano actividad-reposo, también denominado actividad-inactividad, y muchas veces de manera incorrecta sueño-vigilia, corresponde al ritmo en la actividad motora presente en la mayoría de los organismos. Durante un periodo aproximado de 24 h la actividad de los organismo pasa de tener una fase en la que es mínima a una fase máxima (Zhdanova, 2006). La fase de mínima actividad o reposo, muchas veces se denomina sueño, y puede llevar a confusión. El sueño puede definirse de diferentes formas, y dependiendo los criterios que se sigan se consideraran más o menos grupos de organismos los que lo presentan (S. Reebbs, 1992).

Por un lado, encontraríamos el sueño definido mediante criterios electrofisiológicos. En este caso el sueño solo se encontraría en mamíferos y aves, ya que se basa en lecturas de patrones característicos en los encefalogramas (EEG) durante esta fase, y para medirlos es necesario realizar registros a nivel de córtex cerebral, estructura que no se encuentra en vertebrados inferiores. Durante el sueño, se observa una alternancia de fases observable en el EEG. Se alterna la fase NREM (no movimientos oculares rápidos) asociada a una disminución metabólica y de la actividad neuronal cortical y subcortical, acompañada de una gran disminución del tono muscular; con la fase REM (movimientos oculares rápidos) asociada a una actividad metabólica y neuronal cortical y subcortical similar a la vigilia, pero con una suspensión total del tono muscular y de la percepción del entorno (S. Reebbs, 1992; Zhdanova, 2006; Zhdanova & Reebbs, 2005).

Por otro lado, aparecería el sueño definido a partir de criterios comportamentales. Los rasgos de comportamiento que definirían el sueño son, el mantenerse en un estado de quietud prolongado, el adoptar una postura de reposo típica para ese organismo, elevación de los umbrales de excitación, y la adquisición de la capacidad de revertir estos procesos en respuesta a una estimulación moderadamente elevada (S. Reebbs, 1992; Zhdanova, 2006; Zhdanova & Reebbs, 2005).

Sea uno u otro el criterio seleccionado para definir el sueño, existen dos mecanismos principales relacionados con la regulación del inicio y el mantenimiento de esta fase de inactividad (Fig. 7). Un primer proceso homeostático reactivo, dependiente de la fase de actividad, induciendo la fase de reposo cuanto más larga sea la fase de actividad, teniendo un papel importante los niveles de Adenosina; y un proceso circadiano predictivo, sincronizado a partir del ciclo ambiental día-noche, indicado mediante la temperatura corporal (alta correlación con la propensión al sueño), independientemente del comportamiento nocturno o diurno del animal (Borbély, 1982; Zhdanova, 2006; Zhdanova & Reeb, 2005).



**Fig. 5:** Representación gráfica de los dos mecanismos reguladores del "sueño". S= proceso homeostático reactivo representado mediante los niveles de Adenosina. C= proceso circadiano predictivo representado por la temperatura corporal. (Adaptación de Borbély, 1982).

Además, para que este ritmo de actividad-reposos se considere que está regulado por un proceso circadiano, debe cumplir una serie de condiciones. Debe ser sincronizado (arrastrado) por estímulos externos, en este caso el ciclo ambiental de día-noche. También, en ausencia de este estímulo, el ritmo debe mantenerse de manera endógena en estado de curso libre con un periodo aproximado de 24 h, definido por la Tau (longitud del periodo circadiano específico de cada individuo, que refleja el ritmo del reloj molecular endógeno). Y finalmente, el ritmo debe estar compensado por la temperatura, es decir la periodicidad circadiana debe mantenerse a diferentes temperaturas fisiológicas (Helm et al., 2017; Santos et al., 2016).

### 1.3.1. Ritmo actividad-reposo en peces

En los peces teleósteos, aparecen limitaciones anatómicas a la hora de poder medir los patrones característicos del sueño mediante EEG. Esto es debido al rudimentario córtex que estos presentan, siendo necesario una corteza cerebral completa para tomar estas medidas (Zhdanova & Reebbs, 2005). Sin embargo, múltiples estudios muestran la existencia del ritmo actividad-reposos en los peces. Además, durante la fase de reposo, muchos de los peces presentan las características propias del sueño definido por criterios comportamentales, por lo que no se descarta la presencia de los patrones de EEG característicos, si estos fueran medibles (Zhdanova, 2006).

Este ritmo biológico, se encuentra sincronizado por el ciclo ambiental de luz-oscuridad, que como ya se ha comentado, es el encargado de regular la expresión y síntesis de la hormona melatonina a lo largo del día, siendo máxima durante la noche (Saha et al., 2019). Son estos niveles de melatonina los que regulan la actividad de los peces, induciendo así la aparición del ciclo. Por lo que, independientemente del comportamiento nocturno y diurno del animal, los niveles de melatonina son altos por la noche, y bajos durante el día. Siendo el aumento de la melatonina el que induce el “sueño” en los peces diurnos, mientras que la disminución de sus niveles lo induce en los nocturnos (Zhdanova, 2006).

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Este trabajo pretende estudiar el ritmo circadiano actividad-reposo de peces teleósteos en su propio hábitat, y determinar como la época de reproducción puede alterar a este ritmo biológico. Para ello, gracias a los datos recolectados, mediante la aplicación de una novedosa metodología (Aspillaga et al., 2021), durante el desarrollo del proyecto titulado como “Causas y consecuencias de la variabilidad del comportamiento relacionado con los ritmos circadianos en peces marinos salvajes” (CLOCKS), se analizan los valores de actividad, entendidos como el desplazamiento en m/min, de la especie de pez teleósteo conocida como *Xyrichtys novacula*, de alto valor comercial y culinario en la Mediterránea occidental.

Por lo tanto, el objetivo principal del trabajo sería estudiar el ritmo circadiano de actividad-reposo en la especie *Xyrichtys novacula*, antes y durante la época de reproducción. Teniendo en consideración que los valores analizados proceden de mediciones tomadas del propio hábitat del pez.

Se parte de la hipótesis de que la época de reproducción de *Xyrichtys novacula* altera de manera significativa la expresión del ritmo circadiano de actividad-reposo que presentan estos peces. Además, como hipótesis secundaria, este ritmo biológico es diferente en función del sexo del pez.

Por lo que los objetivos específicos de este trabajo son:

- Definir el ritmo circadiano actividad-reposo de *Xyrichtys novacula* a partir de los valores no paramétricos que caracterizan a los ritmos biológicos y valores de la actividad.
- Determinar la influencia de la época de reproducción en la manifestación de este ritmo circadiano.
- Determinar la influencia del sexo del pez en la manifestación de este ritmo circadiano.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos, analizados durante la realización de este trabajo, forman parte de los obtenidos durante el desarrollo del proyecto de investigación titulado “Causas y consecuencias de la variabilidad del comportamiento relacionado con los ritmos circadianos en peces marinos salvajes” (CLOCKS) en el que se encuentran involucrados el grupo de Ecología de peces del Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (IMDEA, CSIC-UIB), el Laboratorio de Neurofisiología del sueño y ritmos biológicos de la Universidad de las Islas Baleares (UIB) y el Laboratorio aplicado de investigación marina y acuicultura (LIMIA, Gobierno Balear).

Entre los objetivos de este proyecto se encontraba el de investigar la causa y consecuencias de los cronotipos, que es la expresión de los ritmos circadianos internos cuando interactúan con el ambiente (Roenneberg et al., 2003), en los peces. Para ello se utilizó una tecnología novedosa de telemetría acústica, que se utilizó por primera vez en el mar para monitorear el comportamiento de los peces en su propio hábitat (Aspillaga et al., 2021).

#### 3.1. *Xyrichtys novacula*, etiquetado de los peces con los micro-transmisores JSATS

*Xyrichtys novacula*, comúnmente conocido como Raor en Baleares y Galán, Lorito, Pez Peine... en la Península Ibérica, es un pez Teleosteo perteneciente a la familia *Labridae* que habita a poca profundidad (hasta los 90 m aproximadamente) en zonas de agua clara y fondos arenosos subtropicales (costa este y oeste del Atlántico, y el Mar Mediterráneo) (Castriota et al., 2005; Katsanevakis, 2005; Vaquer-Sunyer et al., 2020). Son peces con un comportamiento muy marcado, durante la noche se entierran en los fondos arenosos para protegerse de la depredación y descansar, y durante el día, se desentierran y siguen un comportamiento bentónico alimentándose activamente (Castriota et al., 2005).

Presentan un claro dimorfismo sexual (Fig. 8), donde el macho presenta un tamaño superior a la hembra, además de presentar la forma de la cabeza diferente, una mayor longitud de la aleta pélvica y una coloración más verdosa con ausencia de la mancha que caracteriza a las hembras (Katsanevakis, 2005). Es un organismo hermafrodita proterogínico o secuencial (nacen y maduran como hembras, y en determinadas ocasiones pasan a ser machos) con marcado comportamiento social durante la época de reproducción (Julio y Agosto), en lo que cada macho posee un harén de hembras con una jerarquía muy marcada (Candi et al., 2004).

En Baleares esta especie es muy apreciada económicamente, por lo que su pesca se encuentra regulada, limitando la época y el número de ejemplares que pueden pescarse, evitando de esta forma el fenómeno conocido como “Fiebre del Raor”. (Vaquer-Sunyer et al., 2020).

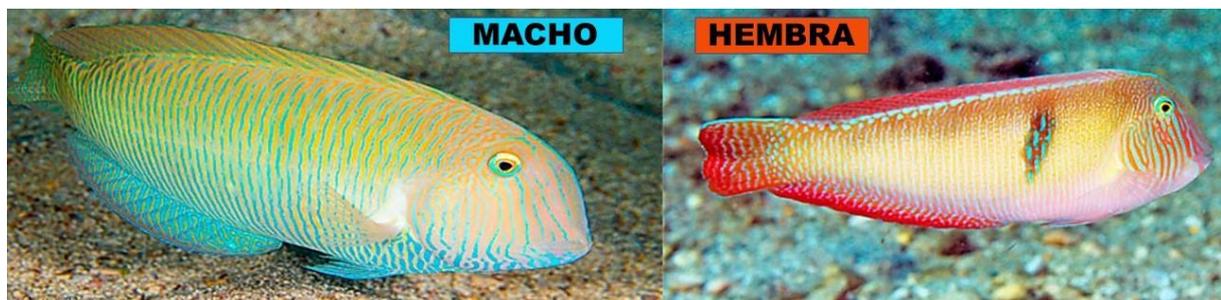


Fig. 8: Dimorfismo sexual en *Xyrichtys novacula*, a la izquierda de la figura se encuentra un ejemplar macho y a la derecha una hembra.

Para este trabajo se seleccionaron los 39 ejemplares con la mejor caracterización de la actividad, de todos los analizados durante el desarrollo del proyecto CLOCKS. Más concretamente se analizaron 16 hembras (de un tamaño aproximado de  $15,31 \pm 0,81$  cm) y 23 machos (de un tamaño aproximado de  $19,64 \pm 1,09$  cm). Se midió la actividad de estos peces a partir de los metros que recorrían por minuto de tiempo, para ello se capturaron con el método tradicional de pesca con anzuelo entre 4 y 18 días antes de empezar el primer período de medición. Siguiendo todos los protocolos higiénicos adecuados, y teniendo los permisos necesarios, se sumergió cada ejemplar en una solución de 0,1 g/L del anestésico metanosulfonato de tricaina y se les implantaron los micro-transmisores JSATS (Fig. 9-E) en la cavidad peritoneal a través de una pequeña incisión ventral, que luego se cerró con suturas no reabsorbibles. Previos a la liberación, los ejemplares se colocan en un tanque con agua del mar limpia hasta que recuperen su comportamiento normal.

### 3.2. Lugar y condiciones de estudio

La medición de la actividad de los peces se llevó a cabo durante los meses de primavera y verano del año 2019, más concretamente, los datos utilizados pertenecen a 2 períodos de medición de unos 20 días. Se realizó una primera medición durante la época pre-reproductiva de los peces, desde el 13 de mayo al 2 de junio; y una segunda medición desde el 1 al 21 de julio, durante la época reproductiva.

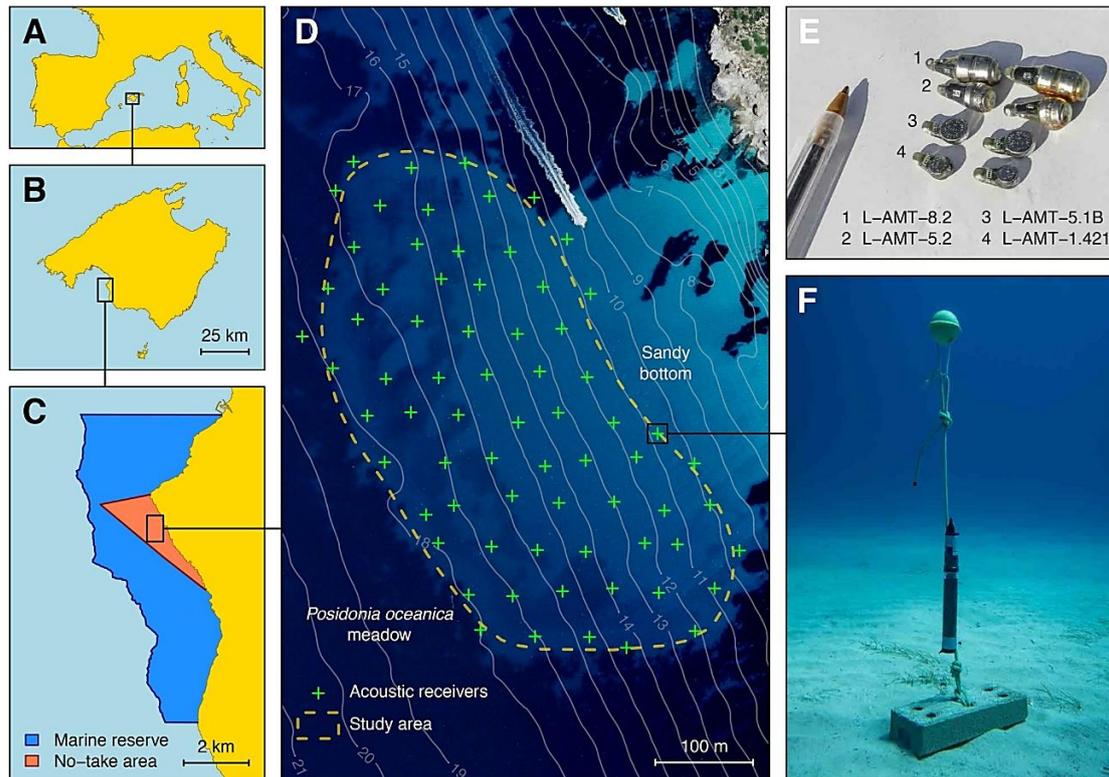
La temperatura del agua se midió cada 10 minutos a partir de un registrador localizado al centro de la zona de estudio a unos 14 m de profundidad, dando una temperatura media de  $18,30 \pm 0,64$  °C durante la primera medición y de  $24,52 \pm 1,56$  °C durante la segunda. Por otro lado, las horas de luz diarias, se han calcularon, teniendo un total aproximado de 14 horas 31 minutos de luz durante la primera medición, y de 14 horas 44 minutos durante la segunda.

La zona seleccionada para la realización del experimento fue la reserva marina de la Bahía de Palma (Mallorca, Islas Baleares; Fig. 9-A, B, C), más concretamente se seleccionó un área arenosa próxima a la costa en el área de veda de la reserva (Fig. 9-D). Esta zona se eligió porque cumplía con una serie de características adecuadas para este estudio, como puede ser el pequeño relativamente pequeño (600 m por 270 m, con un área de 12,5 ha, y una profundidad de entre 11 y 19 m), estar delimitada por una pradera de *Posidonia oceánica* que funciona como barrera natural que limitaba la movilidad de los individuos de estudio en esa zona, y, además, el área está habitada por una gran población de *Xyrichtys novacula*.

### 3.3. Monitoreo de la actividad de los peces

Para monitorear a los peces, se utilizó el sistema de seguimiento de alta resolución JSATS (Sistema de telemetría acústica de salmón juvenil) de “Lotek Wireless Inc.”, compuesto por micro-transmisores acústicos de la serie L-AMT (Fig. 9-E) y receptores acústicos autónomos modelo WHS-4250L (Fig. 9-F). Al seleccionar este tipo de transmisores de pequeño tamaño, se puede estudiar casi todos los rangos de talla en los peces, a diferencia de sistemas similares anteriores. Se colocaron un total de 70 receptores, a una distancia de 50 m, formando un patrón triangular equilátero (Fig. 9-D). Se desarrolló un algoritmo capaz de triangular la posición exacta del pez que porte el transmisor, mediante la captación de al menos 3 receptores de la señal acústica a 416,7 kHz emitida por el micro-transmisor. De esta forma, con esta nueva tecnología, se puede hacer el seguimiento de múltiples peces a la vez, ya que es capaz de captar señales emitidas entre ellas con un tiempo de 1 milisegundo aproximadamente, a una distancia de hasta 1000 m en mar abierto.

En los datos tratados en este trabajo, la información recogida por este sistema se utilizó para tener información de la actividad de los peces, a partir de conocer su desplazamiento en metros por minuto (m/min), es decir, cuantos metros se ha desplazado el pez en un tiempo determinado. Por lo que, a mayor distancia desplazada por el pez, mayor actividad tiene el organismo en ese momento. El intervalo de medición de la actividad de los peces fue de 1 minuto, posteriormente esta información fue tratada por un algoritmo para tener los datos de actividad individual junto a la fecha y hora exacta en la que se tomaron, obteniendo así archivos de datos individuales de cada pez, conteniendo en una columna la hora y la fecha, y en otra la actividad (desplazamiento en metros) durante ese minuto. Posteriormente estos archivos son los que se analizan en este trabajo.



**Fig. 9:** Localización de la zona de estudio en la reserva marina de la Bahía de Palma en la isla de Mallorca (A-C), distribución de los receptores acústicos en la zona de estudio (D), y modelos de micro-transmisores JSATS (E) y receptores acústicos WHS-4250L (F) utilizados. (Aspillaga et al., 2021).

### 3.4. Análisis de los datos

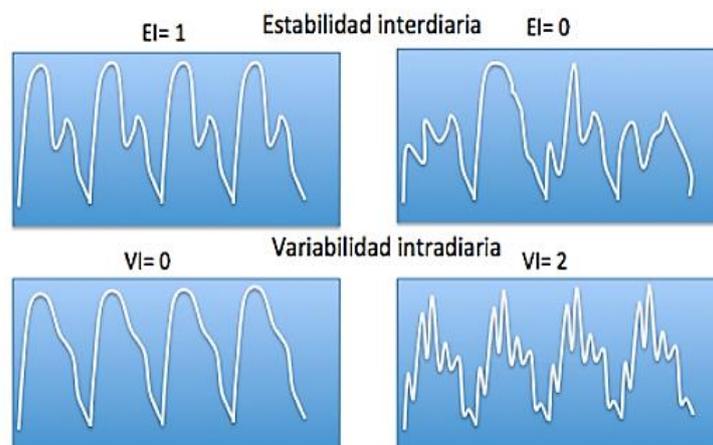
#### 3.4.1. Análisis visual

El actograma es la representación gráfica de los valores de una variable biológica, en cuyo eje de ordenadas se representa el valor de la variable en cada ciclo y en el eje de abscisas las horas del día (Madrid, 2006). Dicho de otra manera, el actograma consiste en el ordenamiento consecutivo de gráficas de ocurrencia de eventos (Vega, 1993). Este ordenamiento vertical de los datos nos permite observar el encarrilamiento a los ciclos de luz-oscuridad ambientales y el desfase de la actividad en condiciones constantes. En este proyecto, los actogramas fueron elaborados mediante el programa OriginPro.

### 3.4.2. Análisis no paramétrico del Ritmo circadiano de actividad-inactividad

A partir de los datos de actividad (desplazamiento en m/min) obtenidos en los 39 ejemplares estudiados, durante la época pre-reproductiva y reproductiva, se estudia el ritmo biológico de reposo-actividad. Este ritmo biológico se estudia generalmente en humanos y en animales, utilizando la actigrafía. En esta metodología, se ajustan los datos de actividad a una función coseno, que permite analizar la ritmicidad circadiana a partir de los parámetros que describen esta función (MESOR, periodo, amplitud y acrofase). Sin embargo, el ritmo biológico de sueño-vigilia, no se ajusta exactamente a la función coseno, por lo que se han desarrollado nuevas metodologías para analizar este ritmo a partir de variables no paramétricas (no se ajustan a parámetros de una función) (Gonçalves et al., 2014).

Se utilizó el paquete gratuito “nparACT” descargado en el programa bioinformático R (Blume et al., 2016), para analizar los datos de actividad medidos en los peces. Las variables que se obtienen son la Variabilidad Intradiaria (IV), la Estabilidad entre Días (IS) y la Amplitud Relativa (RA).



**Fig. 10:** Representación gráfica de un ritmo biológico cuando: Arriba-El valor de IS (estabilidad entre días) es máxima (ritmo totalmente sincronizado) frente a cuando es 0 (ritmo totalmente desincronizado); Abajo- El valor de IV (variabilidad intradiaria) es 0 (se ajusta perfectamente a una onda sinusoidal) frente a cuando es 2 (ritmo totalmente fragmentado) (Madrid & Rol de Lama, 2015).

La IS y la IV miden respectivamente la sincronización y la fragmentación del ritmo biológico. Más concretamente, la IV, a partir de cuantificar con qué frecuencia y alcance ocurren las transiciones entre el reposo y la actividad en un intervalo horario determinado (24 horas), permite ver lo fragmentado que se encuentra el ritmo (Gonçalves et al., 2014). La IV puede ir de 0, cuando el ritmo se ajusta perfectamente a la onda sinusoidal, a 2 cuando está totalmente fragmentado (Fig. 10), indicando períodos de actividad cuando se debería descansar o viceversa (Blume et al., 2016). Por otro lado, IS indica la sincronización del ritmo interno con el ritmo externo del sincronizador o “zeitgeber” (ritmo luz-oscuridad de 24 h) (Gonçalves et al., 2014). La IS va de 0 a 1, cuanto más alto sea el valor más sincronizado está el ritmo a estudiar (Fig. 10) (Blume et al., 2016). Finalmente, RA, se calcula a partir de la actividad media durante el periodo más activo de 10 horas (M10) y la actividad media durante el periodo menos activo de 5 horas (L5), aproximándose a 1 cuando los valores de actividad más bajos se aproximan a 0, y a 1 cuando los valores de actividad más bajos son muy similares a los de actividad muy alta (no ritmo) (Gonçalves et al., 2014). Además, el paquete ofrece tan el valor de L5 y M10, como la hora promedio en la que inician ambos periodos.

### 3.4.3. Análisis de la actividad

A partir de los datos de actividad (desplazamiento en m/min) obtenidos en los 39 ejemplares estudiados, durante la época pre-reproductiva y reproductiva, se calcularon determinados valores que definen la actividad de estos peces. A partir del software de análisis cronobiológico “Chronoshop”, se obtuvieron los siguientes valores de actividad de cada uno de los peces:

- Actividad máxima (m): son el máximo de metros que ha recorrido el pez en un intervalo de un minuto, de todos los valores recolectados durante la medición.
- Media de actividad por ciclo (m): indica la media de metros recorridos por el pez en un ciclo completo o día. Es decir, es la media de la distancia total recorrida por el pez en cada uno de los días que duró la medición.

Por otro lado, mediante el programa informático OriginPro, se representaron los cronogramas del ritmo de actividad-reposo promedio de cada uno de los cuatro grupos en los que se han agrupado los peces (machos prereproducción, machos reproducción, hembras prereproducción, hembras reproducción). Además, de realizar, con el mismo programa, varias representaciones gráficas, que permiten diferenciar de manera visual, las diferencias de actividad (desplazamiento) en estos 4 grupos.

### 3.4.4. Análisis estadísticos

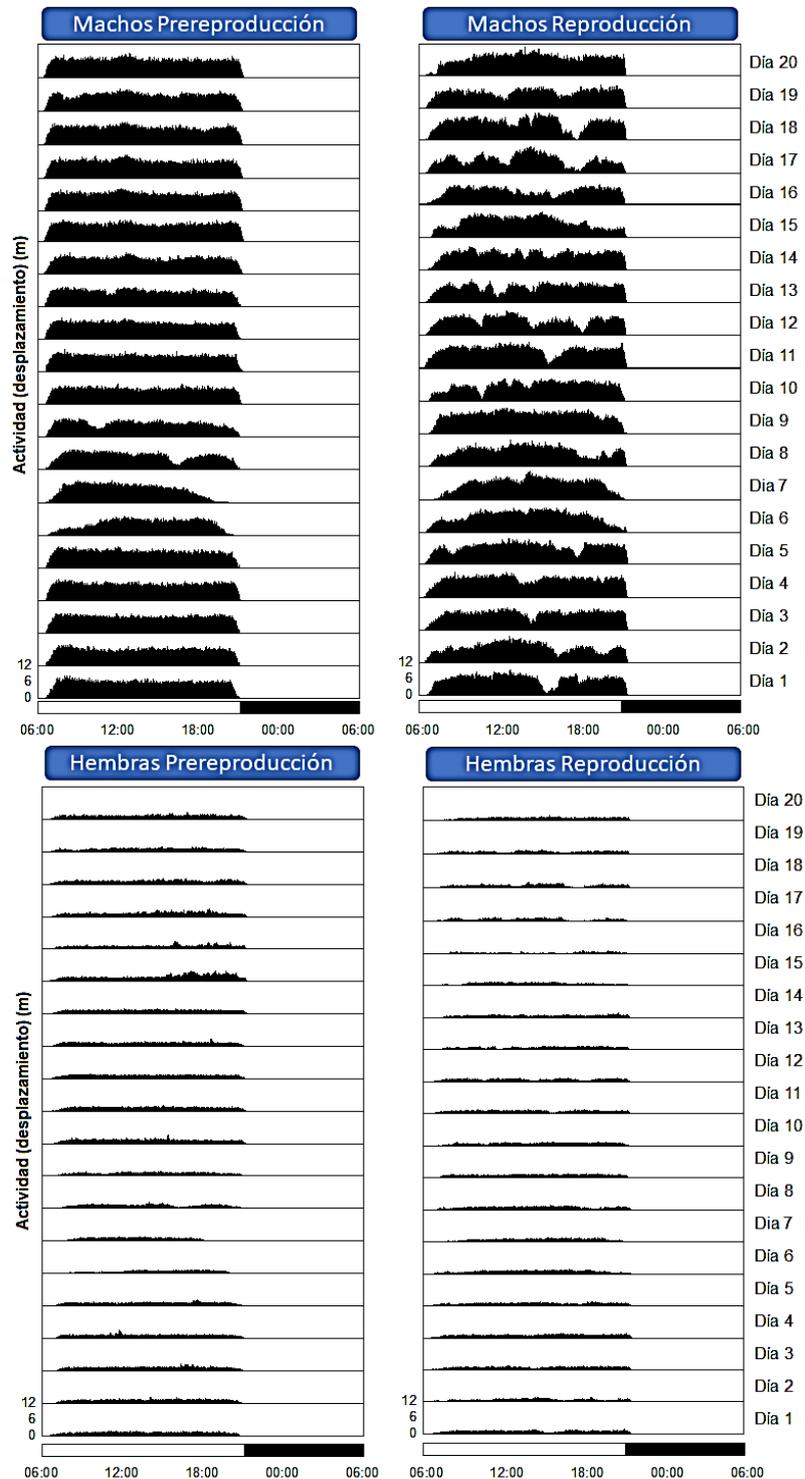
Una vez determinados los diferentes valores no paramétricos que definen el ritmo actividad-reposo, y los valores de actividad, de los 39 organismos analizados, se realizó la estadística para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos en los cuales se han dividido los ejemplares. Se utilizó el programa estadístico R para comparar estadísticamente los diferentes valores medios calculados. Se realizaron las siguientes comparaciones:

- Machos en el periodo prereproductivo con machos en el periodo reproductivo. En este caso al tratarse de los mismos individuos en dos momentos diferentes, se realizó la estadística para muestras pareadas.
- Hembras en el periodo prereproductivo con Hembras en el periodo reproductivo. En este caso al tratarse de los mismos individuos en dos momentos diferentes, se realizó la estadística para muestras pareadas.
- Machos en el periodo prereproductivo con Hembras en el periodo prereproductivo. En este caso al tratarse de grupos de individuos diferentes, se realizó la estadística para muestras no pareadas.
- Machos en el periodo reproductivo con Hembras en el periodo reproductivo. En este caso al tratarse de grupos de individuos diferentes, se realizó la estadística para muestras no pareadas.

El test estadístico que se utilizó dependió de si los valores obtenidos cumplían con los parámetros necesarios para realizar ese test. Para las comparaciones de muestras pareadas, si ambos grupos de datos seguían una distribución normal (determinado mediante el test estadístico de Shapiro-Wilk), se realiza la comparación mediante la prueba t de Student (Test-T) para muestras pareadas; en el caso de no cumplir la normalidad, se realizó su equivalente no paramétrico, el test de Wilcoxon Mann Whitney. Para las comparaciones de muestras no pareadas, se comprobó la normalidad de la misma manera, y si no se cumplía se aplicó el test de Wilcoxon Mann Whitney para muestras no pareadas; en el caso de cumplir la normalidad, se analizó si existía homogeneidad de varianzas entre ambos grupos, para ello se aplicó el test estadístico de Bartlett. Si se cumplía tanto normalidad como homogeneidad de varianzas, se realizó la prueba t de Student (Test-T) para muestras no pareadas, y en el caso de cumplir la normalidad, pero no la homogeneidad de varianzas, se aplicó la corrección de Welch al Test-T. El nivel de significancia mínimo para todas las pruebas estadísticas fue de 0,05.

## 4. RESULTADOS

Encarrilamiento de la actividad locomotora a ciclos de luz y oscuridad ambientales. Los resultados muestran que los peces están encarrilados a ciclos de 24 horas de luz-oscuridad ambientales, tanto durante el periodo de prereproducción como en periodos de reproducción.

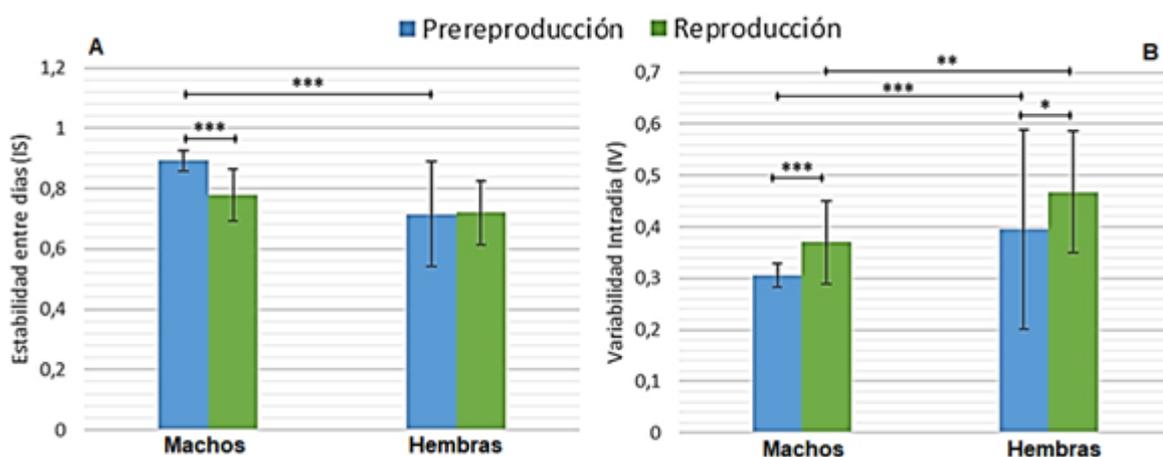


**Fig. 11:** Actogramas del ciclo actividad-reposo promedio para cada uno de los 4 grupos en los que se han dividido los peces analizados. Se observa una mayor actividad en forma de desplazamiento (m) en los machos, independientemente del periodo.

Al analizar los valores de actividad, entendida como el desplazamiento de los peces analizados, se observa que los Actogramas (Fig. 11) y los valores no paramétricos que definen el ritmo circadiano de actividad-reposo, calculados en los diferentes grupos de peces analizados, se relacionan con la existencia de un ritmo bien definido, presentando mayor actividad en forma de desplazamiento en los machos para ambos periodos analizados.

Además, el valor promedio de IS en machos y hembras, antes y durante el periodo de reproducción estaba más próximo a 1 que a 0; indicando así que el ritmo circadiano analizado se encontraba bastante sincronizado tanto en ambos sexos como en ambos periodos. Sin embargo, se observa que el valor promedio de IS en machos manifestó una disminución estadísticamente significativa durante la época de reproducción (Fig. 12-A), pasando de ser  $0,893 \pm 0,034$  a  $0,778 \pm 0,086$ , lo que indicaría una mayor desincronización del ritmo durante la reproducción. En el caso de las hembras, no se observan diferencias estadísticas entre el valor IS antes y durante la reproducción (Fig. 12-A), siendo respectivamente  $0,715 \pm 0,174$  y  $0,720 \pm 0,107$ . Al comparar entre sexos, durante el periodo de prereproducción, las hembras presentaban un valor promedio de IS ( $0,715 \pm 0,174$ ) estadísticamente menor al de los machos ( $0,893 \pm 0,034$ ), teniendo el ritmo circadiano de actividad-reposo una peor sincronización en hembras durante este periodo (Fig. 12-A). Sin embargo, esta diferencia entre sexos desaparece durante la reproducción, siendo ligeramente mayor en machos ( $0,778 \pm 0,086$ ), pero sin observar diferencias estadísticas con las hembras ( $0,720 \pm 0,107$ ) (Fig. 12-A).

En el caso del promedio de IV en machos y hembras, antes y durante el periodo de reproducción, se observa que se encontraba más próximo a 0 que a 2. Lo que indica que el ritmo circadiano analizado se encontraba poco fragmentado tanto en ambos sexos como en ambos periodos. Sin embargo, se observa que el valor promedio de IV en machos manifestó un aumento estadísticamente significativo durante la época de reproducción (Fig. 12-B), pasando de ser  $0,305 \pm 0,023$  a  $0,370 \pm 0,080$ , lo que indicaría una mayor fragmentación del ritmo durante la reproducción. En el caso de las hembras, ocurre igual que en los machos (Fig. 12-B), siendo el valor promedio antes y durante la reproducción de  $0,395 \pm 0,194$  y  $0,468 \pm 0,119$ . Al comparar entre sexos, durante el periodo de prereproducción, las hembras presentaban un valor promedio de IV ( $0,395 \pm 0,194$ ) estadísticamente mayor al de los machos ( $0,305 \pm 0,023$ ) (Fig. 12-B). Y lo mismo ocurre durante el periodo de reproducción, presentando un valor promedio de IV más elevado en hembras ( $0,468 \pm 0,119$  frente a  $0,370 \pm 0,080$ ) (Fig. 12-B).

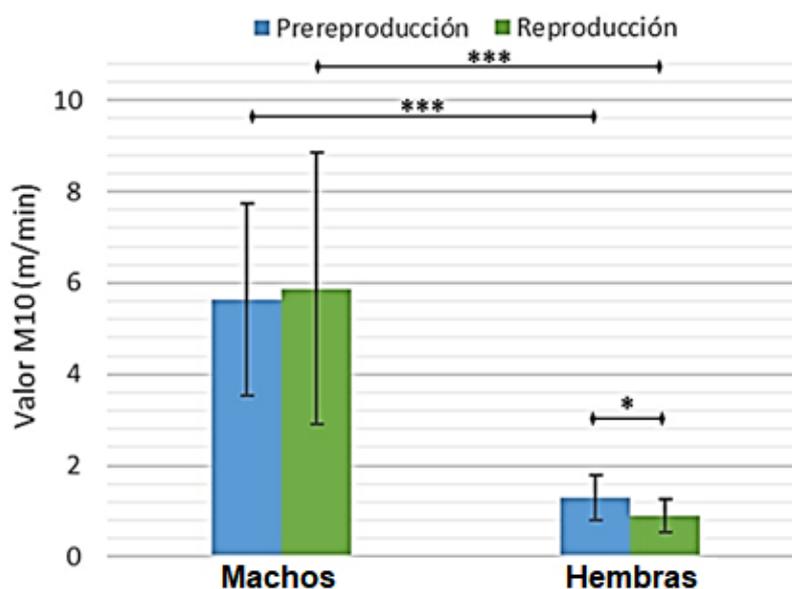


**Fig. 12:** Valores no paramétricos que definen el ritmo actividad-reposo. **(A)** Valor promedio de la Estabilidad entre Días (IS) del ritmo circadiano actividad-reposo en peces macho y hembra, antes y durante el periodo de reproducción. **(B)** Valor promedio de la Variabilidad Intradía (IV) del ritmo circadiano actividad-reposo en peces macho y hembra, antes y durante el periodo de reproducción. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SD,  $n = 23$  peces macho y 16 peces hembra, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Para los valores de RA, se observa que es 1 para todos los peces analizados. La explicación a este hecho es muy sencilla, ya que, RA se calcula a partir de la actividad media durante el periodo más activo de 10 horas (M10) y la actividad media durante el periodo menos activo de 5 horas (L5), concretamente es el valor de M10 menos el valor de L5, dividido el valor de M10 más L5 (Blume et al., 2016). Al utilizar *Xyrichtys novacula* como organismo de estudio, debido a su comportamiento de enterrarse durante la noche y permanecer inmóvil, el valor medio de actividad durante las 5 horas de mínima actividad (L5) va a ser siempre de 0 m/min, haciendo que el valor de RA para todos los peces sea 1.

Una vez determinado el estado del ritmo circadiano de actividad-reposo en los peces analizados, se pasa a observar las diferencias que existen en la actividad de estos peces. Como se ha comentado, la actividad analizada va en función del desplazamiento en metros de los peces en una unidad de tiempo correspondiente al minuto. En general se observan diferencias en la actividad, tanto para parámetros específicos como puede ser el valor M10, la actividad media por ciclo, y la actividad máxima; además de para la hora de inicio de M10 y L5; y también en la propia representación gráfica del desplazamiento promedio en cada una de las mediciones tomadas en intervalos de 1 minuto, para los 4 grupos en los que se han dividido los peces.

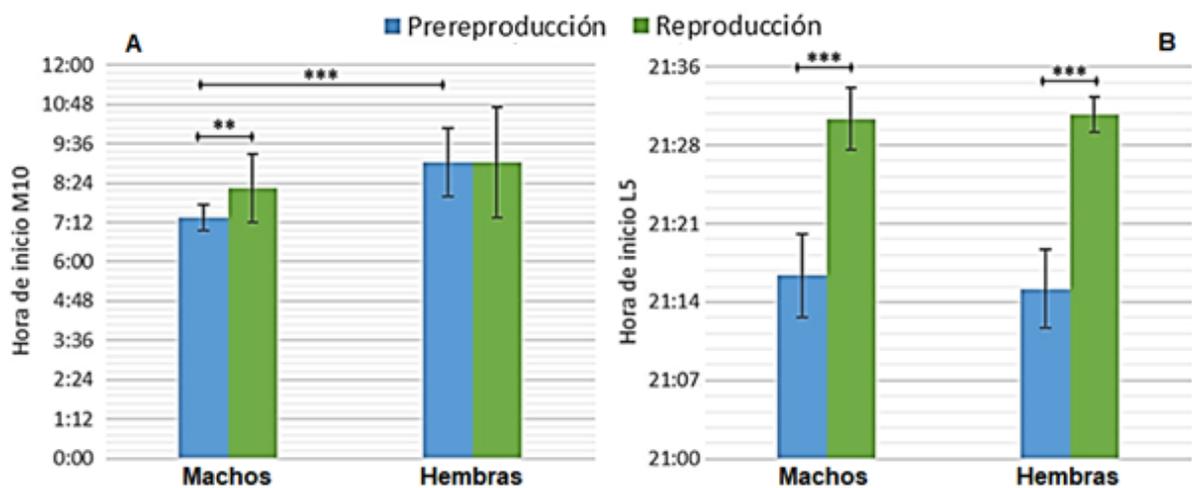
Se observan diferencias en el valor M10 y en la hora de inicio de estas 10 horas de máxima actividad, entre sexos y periodos analizados. El valor promedio de M10 en machos no manifestó diferencias al compararse lo periodos de antes y durante la reproducción (Fig. 13); pasó de ser  $5,629 \pm 2,105$  m/min a  $5,877 \pm 2,973$  m/min. En el caso de las hembras, sí que se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos periodos analizados (Fig. 13), siendo el valor promedio antes y durante la reproducción de  $1,289 \pm 0,488$  m/min y  $0,897 \pm 0,352$  m/min. Al comparar entre sexos, durante el periodo de prereproducción, las hembras presentaban un valor promedio de M10 ( $1,289 \pm 0,488$  m/min) estadísticamente inferior al de los machos ( $5,629 \pm 2,105$  m/min) (Fig. 13). Y lo mismo ocurre durante el periodo de reproducción, presentando un valor promedio de M10 más elevado en machos ( $5,877 \pm 2,973$  m/min frente a  $0,897 \pm 0,352$  m/min) (Fig. 13).



**Fig. 13:** Valor promedio de la actividad media en las 10 horas de máxima actividad (M10) del ritmo circadiano actividad-reposo en peces macho y hembra, antes y durante el periodo de reproducción. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SD, n= 23 peces macho y 16 peces hembra, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Por otro lado, en el caso de la hora de inicio de M10 (sin ser exactamente la hora de “despertarse” de los peces, da una idea aproximada de cuando es), se observa que en los machos pasó de ser aproximadamente a las 7:21 de la mañana, durante la época prereproductiva, a ser sobre las 8:14, durante la época reproductiva (Fig. 14-A); siendo valores estadísticamente diferentes. En el caso de las hembras, esta diferencia no se observa, tenida una hora de inicio de M10 aproximadamente a las 9:00 de la mañana durante los dos periodos analizados (Fig. 14-A). Al comparar entre sexos, se observa, que la hora de inicio de M10 fue más tardía en hembras, tanto en el periodo prereproductivo como reproductivo (Fig. 14-A), sin embargo, solo se tienen evidencias estadísticamente significativas durante la prereproducción.

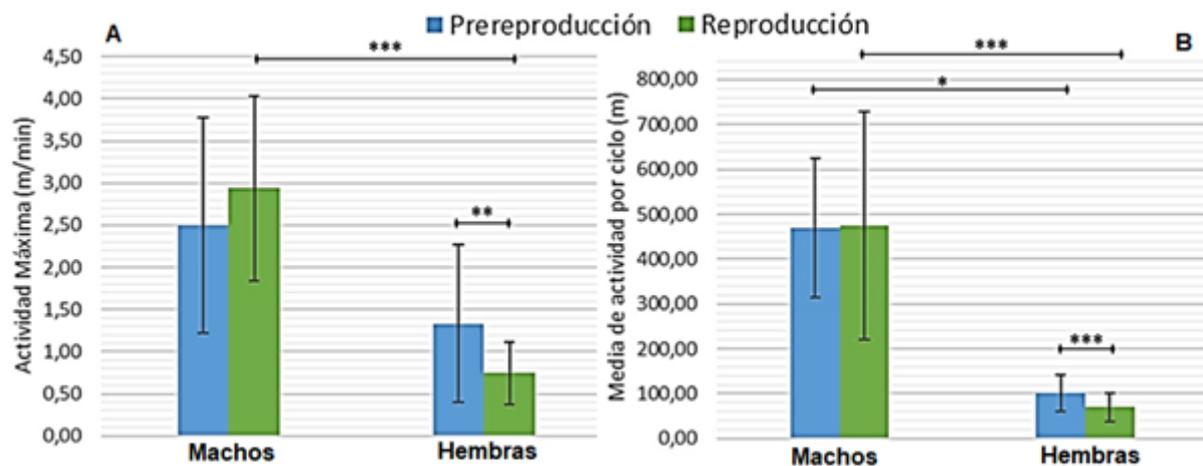
Para los resultados obtenidos respecto a la hora de inicio de L5, que no es exactamente la hora del inicio del reposo, pero puede darnos una idea, se observa que únicamente existen diferencias estadísticamente significativas entre los periodos analizados, pasando de ser aproximadamente durante la prereproducción a las 21:15, tanto en machos y hembras, a ser durante la reproducción a las 21:30 (Fig. 14-B).



**Fig. 14:** Hora de inicio de las 10 horas de máxima actividad (M10), y de las 5 horas de mínima actividad (L5) del ritmo circadiano actividad-reposo analizado. **(A)** Valor promedio de la hora de inicio de M10 del ritmo circadiano actividad-reposo en peces macho y hembra, antes y durante el periodo de reproducción. **(B)** Valor promedio de la hora de inicio de L5 del ritmo circadiano actividad-reposo en peces macho y hembra, antes y durante el periodo de reproducción. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SD,  $n = 23$  peces macho y 16 peces hembra,  $**p < 0,05$ ,  $***p < 0,001$ .

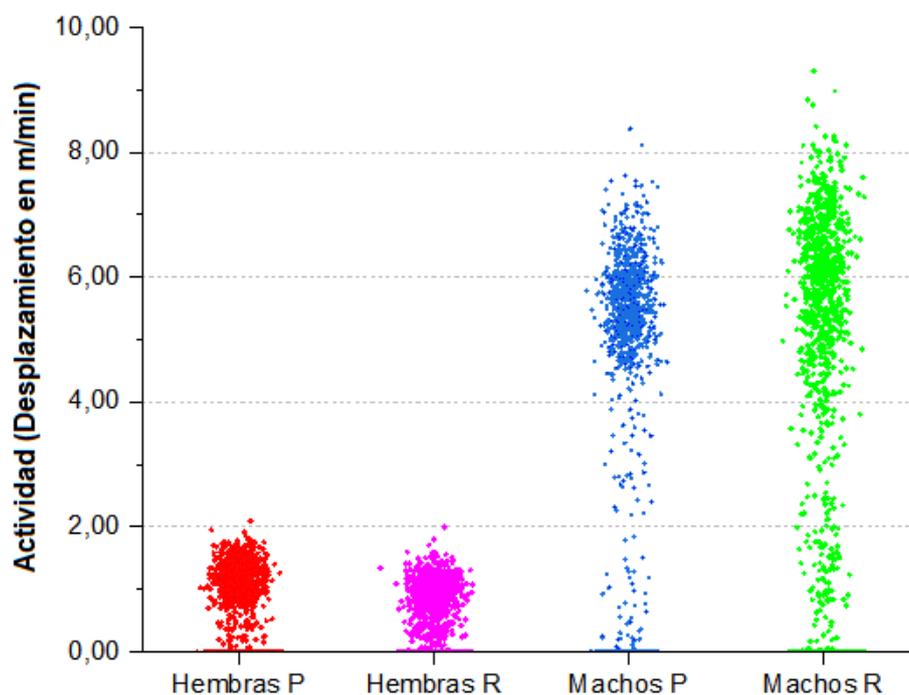
Para los otros valores de actividad calculados, también se observan diferencias. En el caso de la actividad máxima (m/min) de los machos, durante el periodo de prereproducción ( $2,490 \pm 1,280$  m/min) y reproducción ( $2,940 \pm 1,090$  m/min), no se observan diferencias estadísticamente significativas, aunque es ligeramente superior durante la reproducción (Fig. 15-A). Por otro lado, en las hembras sí que se observa una actividad máxima superior estadísticamente significativa durante la prereproducción ( $1,330 \pm 0,930$  m/min, frente a  $0,750 \pm 0,370$  m/min) (Fig. 15-A). Al comparar entre sexos, se observa, que la actividad máxima promedio era superior en machos, tanto en el periodo prereproductivo como reproductivo (Fig. 15-A), sin embargo, solo se tienen evidencias estadísticamente significativas durante la reproducción.

Algo similar ocurre con el valor medio de actividad por ciclo (m). Durante el periodo de prereproducción ( $469,730 \pm 154,670$  m) y reproducción ( $474,45 \pm 255,260$  m), no se observan diferencias estadísticamente significativas entre machos (Fig. 15-B). Sin embargo, en las hembras sí que se observa una actividad media por ciclo superior estadísticamente significativa durante la prereproducción ( $100,940 \pm 40,910$  m, frente a  $69,490 \pm 31,870$  m) (Fig. 15-B). Al comparar entre sexos, se observa, que la actividad media por ciclo era estadísticamente superior en machos, tanto en el periodo prereproductivo como reproductivo (Fig. 15-B).

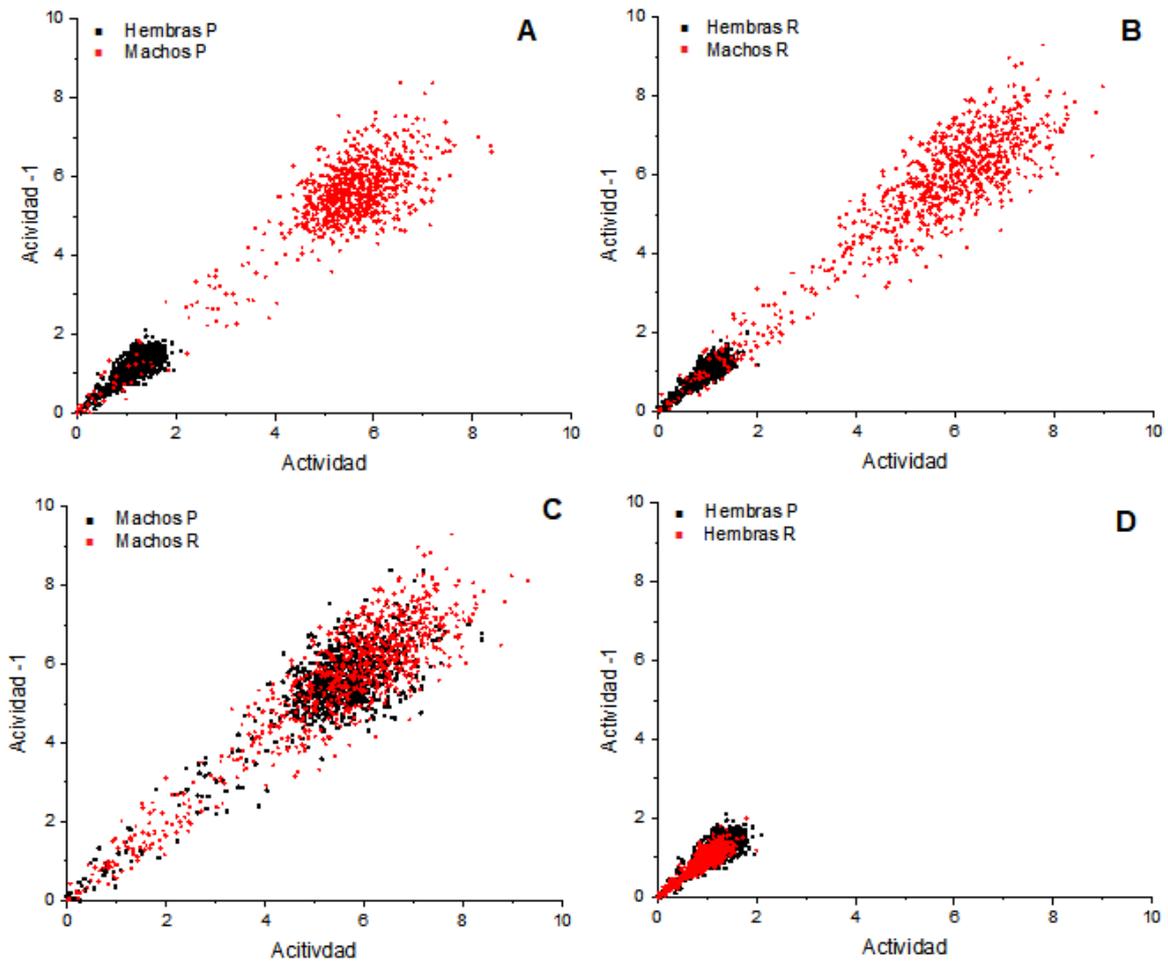


**Fig. 15:** Valores promedio de la actividad entendida como el desplazamiento de los peces analizados. **(A)** Valor promedio de la actividad máxima (m/min) en peces macho y hembra, antes y durante el periodo de reproducción. **(B)** Valor promedio de la actividad media por ciclo (m) en el ritmo circadiano actividad-reposo en peces macho y hembra, antes y durante el periodo de reproducción. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SD,  $n= 23$  peces macho y 16 peces hembra, \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ .

Finalmente, se observa que el desplazamiento por minuto de los machos en general es mucho más superior que en las hembras, para ambos periodos analizados (Fig. 16). Al representar gráficamente los valores promedio del desplazamiento en cada una de las mediciones, mediante un diagrama de Poincaré, se aprecia claramente esta diferencia de actividad, al comparar los grupos de peces analizados dos a dos (Fig. 17).



**Fig. 16:** Distribución de la distancia de desplazamiento promedio para cada una de las mediciones tomadas para cada uno de los 4 grupos analizados. Es notable que los machos recorren distancias más largas en ambos periodos. P=prereproducción, y R=reproducción.



**Fig. 17:** Distribución de la actividad en periodos de prereproducción y de reproducción en diagrama de Poincaré. Es notable que los machos recorren distancias más largas en ambos periodos. **(A)** Hembras y Machos en prereproducción, **(B)** Hembras y Machos en reproducción, **(C)** Machos en prereproducción y en reproducción, **(D)** Hembras en prereproducción y en reproducción.

## 5. DISCUSIÓN

Como se ha comentado, el Raor (*Xyrichtys novacula*) es un pequeño pez Teleósteo muy peculiar, tanto por su hermafroditismo secuencial, su comportamiento formando harenes, y su alto valor culinario y económico en el Mediterráneo.

El análisis durante el desarrollo de este trabajo, de los datos de actividad de los peces recogidos en el proyecto CLOKS, ha demostrado la existencia de un ritmo circadiano claro en la actividad de estos peces. Independientemente del sexo y el periodo (antes o durante la reproducción), la actividad del Raor en su hábitat natural, está determinada por un marcado ritmo circadiano de actividad-reposo claramente sincronizado por el ciclo ambiental de luz-oscuridad.

Los valores próximos a 0 de IV y los valores próximos a 1 de IS en todos los grupos analizados, y, además, un valor de RA de 1 en todos los peces, demuestran la existencia de que este ritmo circadiano se encuentra bien sincronizado con el ambiente, poco fragmentado y los periodos de actividad respecto a los de descanso se encuentran bien diferenciados. Además, se observa que los periodos de actividad se encuentran sincronizados con el día, mientras que el reposo con la noche. En adición, durante la fase de reposo se ha observado que la actividad disminuye hasta ser cero (valor de L5 en todos los peces es 0 m/min), coincidiendo con el comportamiento característico de esta especie, de enterrarse bajo el fondo arenoso durante el reposo. Este patrón de comportamiento dual entre presentar las mayores tasas de actividad durante el día, y reposar enterrados durante la noche, ya fue demostrado en su propio hábitat mediante detecciones con telemetría acústica (Alós et al., 2012). Sin embargo, el presente trabajo, ha permitido determinar que la actividad del Raor viene determinada por un claro ritmo circadiano sincronizado de manera bastante precisa con el ciclo ambiental de luz-oscuridad.

Al pasar a observar diferencias en el ritmo de actividad-reposo entre machos y hembras, antes y durante el periodo de reproducción, se observa de manera general, que el ritmo circadiano, medido directamente en el hábitat natural de estos peces, se encuentra más sincronizado y menos fragmentado en machos, y, además, la reproducción actúa directamente sobre el ritmo, desincronizándolo ligeramente y fragmentándolo. Más concretamente, durante el periodo prereproductivo, la sincronización del ritmo con el ambiente es estadísticamente mayor en los machos, sin embargo, al pasar a la época reproductiva, el ritmo se desincroniza ligeramente, para igualarse a la desincronización de las hembras, que se mantiene igual en los dos periodos estudiados. Algo similar ocurre con la fragmentación del ritmo, en este caso, las hembras presentan estadísticamente una mayor fragmentación del ritmo en ambos periodos estudiados, sin embargo, durante la reproducción, el ritmo presenta una mayor fragmentación en los dos sexos.

Las diferencias entre sexos en el ritmo circadiano que determina la actividad de los peces se han observado en diversos estudios. En condiciones estables de laboratorio (12 h de luz y 12 h de oscuridad) se observaron diferencias en los patrones de actividad entre los sexos de otros peces diurnos, como puede ser la Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Vera et al., 2009). Además se conoce que los patrones de actividad-reposo de los peces muestran una gran plasticidad (Madrid et al., 2001; S. G. Reeb, 2002). Por otro lado, las diferencias observadas entre periodos pueden deberse a diversos factores. En general, la reproducción de la mayoría de peces es estacional y periódica. Al igual que la actividad, la reproducción de los peces viene determinada por un ritmo biológico endógeno dependiente principalmente del fotoperiodo, pero en este caso hablamos de un ritmo circanual, donde la reproducción se produce en la estación más adecuada para el posterior desarrollo de los nuevos individuos. Además, al igual que el ritmo de actividad-reposo, el ritmo biológico de la reproducción, responde a unos patrones determinados de los niveles de melatonina en sangre. Diversos estudios en peces han mostrado la existencia de diferentes patrones en la secreción nocturna de la melatonina, además en un mismo individuo este patrón puede variar al entrar en la época de reproducción (Maitra & Hasan, 2016). Por lo

que se considera que las variaciones del ritmo circadiano de actividad-reposo observadas, podrían deberse, por un lado, al ligero aumento de las horas de luz durante los dos periodos (de media, 14 horas con 30 minutos aproximadamente durante la prereproducción, y 14 horas 45 minutos durante la reproducción), y por otro lado a un posible cambio en el patrón nocturno de secreción de la melatonina al entrar en la época de reproducción, que influiría al ritmo de actividad-reposo, al ser la melatonina uno de los factores que regulan ambos ritmos.

En cuanto a la actividad observada, entendida como el desplazamiento de los peces, se observa que la hora de inicio de L5 es estadísticamente igual en machos y hembra, y solo varía con el periodo estudiado. Esta hora, sin llegar a ser la hora de inicio de la fase de reposo, puede considerarse como algo similar. Las diferencias observadas entre los periodos estudiados, posiblemente con el aumento del fotoperiodo y por lo tanto con el retraso del atardecer que ocurre entre las 2 mediciones. Durante la medición en la fase de prereproducción el atardecer ocurría aproximadamente en promedio a las 21:05, mientras que en la reproducción fue en promedio a las 21:20. Este retraso de 15 min es prácticamente al mismo que se produce en la hora de inicio de L5 al comparar entre periodos, siendo durante la prereproducción en promedio a las 21:15 en ambos sexos, y durante la reproducción a las 21:30. Por lo que se podría decir que el inicio del reposo está directamente relacionado con el atardecer.

En el caso de la hora de inicio de M10, que puede relacionarse con la hora de inicio de la actividad, las diferencias observadas ya no se ajustan a la hora de amanecer. En este caso, para ambos periodos el amanecer ocurre prácticamente a la misma hora, siendo en promedio a las 6:30, por lo que el retraso ocurrido en las hembras respecto a los machos durante la prereproducción, y el retraso ocurrido en los machos al entrar en la reproducción, proviene de causas intrínsecas al animal.

Ocurre algo similar con la actividad de los peces, entendida como el desplazamiento de estos. En todos los diferentes valores de actividad analizados, como en los Actogramas representados, y los diagramas de distribución de Poincaré, el desplazamiento de los machos es muy superior al de las hembras. Además, observando los valores de actividad calculados, al pasar al periodo de reproducción, la actividad de las hembras se ve ligeramente disminuida, mientras que en los machos sigue siendo similar.

Diversos estudios, determinan que la actividad del Raor, que como en este caso, se mide a partir de la distancia recorrida, está directamente relacionada con la personalidad y el comportamiento intrínseco de los peces (Josep Alós et al., 2017). Además, esta especie muestra una personalidad agresiva directamente relacionado con el sexo, siendo mayor en los machos y aumentando considerablemente en los machos dominantes, durante el periodo de reproducción (Martorell-Barceló et al., 2021). También, suelen ser peces bastante sedentarios (que no se alejan mucho del área que habitan), normalmente teniendo actividad en un área menor a 0,5 km<sup>2</sup> (J. Alós et al., 2012) (área similar a la estudiada). Y que además, forman harenes de un macho dominante con un conjunto de hembras (Candi et al., 2004), en los cuales el macho ejerce un gran territorialismo frente al resto de harenes (Cardinale et al., 1998). Todas estas características de comportamiento en el Raor se relacionarían directamente con las diferencias entre los sexos observadas. La mayor actividad de los machos, en forma de desplazamiento, se vería relacionada con su personalidad agresiva y territorial a la hora de defender su harén y el lugar que este habita. Que, unido a la pequeña área en la que habitan todos estos peces estudiados, la necesidad de defender el harén frente a la competencia de los otros machos, se verá agravada, acentuando más esta diferencia de actividad.

Finalmente, las diferencias observadas en la hora de inicio de M10, que se encuentra más adelantada en los machos, también indicaría la necesidad del macho para defender su harén, iniciando esta actividad de defensa, justo antes que las hembras se activen. Y las ligeras diferencias observadas entre sexos en el propio ritmo circadiano de actividad-reposo, también, posiblemente, se deben a estas diferencias de comportamiento presentadas.

## 6. CONCLUSIONES

A partir de la información proporcionada por el proyecto de investigación CLOCKS, se ha estudiado el ritmo circadiano de actividad-reposo y la actividad, entendida como el desplazamiento, de 39 ejemplares de Raor (*Xyrichtys novacula*), en su propio hábitat, antes y durante el periodo de reproducción. Las principales conclusiones obtenidas son las siguientes:

1. *Xyrichtys novacula* expresa un marcado ritmo circadiano de actividad-reposo, poco fragmentado y bien sincronizado con el ciclo ambiental de luz-oscuridad, independientemente del sexo y la época estudiada; donde la actividad se produce durante el día y el descanso durante la noche.
2. Durante la época de reproducción, el ritmo circadiano de actividad-reposo de estos peces, se ve ligeramente más desincronizado y fragmentado, respecto al periodo prereproductivo. Posiblemente causado por el aumento del fotoperiodo, y su consecuente ligera modificación del patrón nocturno de secreción de melatonina.
3. El ritmo circadiano de actividad-reposo en los machos se encuentra ligeramente más sincronizado y menos fragmentado que en las hembras. Posiblemente por las diferencias comportamentales que presentan ambos sexos.
4. La actividad, entendida como el desplazamiento, de los machos, es representativamente más elevada que en las hembras, independientemente del periodo estudiado. Esto, presuntamente, es debido a la propia personalidad agresiva y territorial de los machos, y su necesidad de proteger y vigilar su harén, frente a otros machos.
5. La hora en la que inicia la actividad en los machos está ligeramente más adelantada que en las hembras, presuntamente por el mismo hecho que en las diferencias de actividad. Sin embargo la hora de inicio del reposo viene totalmente determinada por el ciclo ambiental de luz-oscuridad, en concretamente con el anochecer.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alós, J., Cabanellas-Reboredo, M., & Lowerre-Barbieri, S. (2012). Diel behaviour and habitat utilisation by the pearly razorfish during the spawning season. *Marine Ecology Progress Series*, 460, 207-220. <https://doi.org/10.3354/meps09755>
- Alós, Josep, Martorell-Barceló, M., & Campos-Candel, A. (2017). Repeatability of circadian behavioural variation revealed in free-ranging marine fish. *Royal Society Open Science*, 4(2). <https://doi.org/10.1098/rsos.160791>
- Aschoff, J. (1965). Circadian rhythms in Man. *Science*, 148(3676), 1427-1432.
- Aschoff, J., & Wever, R. (1981). The Circadian System of Man. *Biological Rhythms*, 311-331. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6552-9\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6552-9_17)
- Aspillaga, E., Arlinghaus, R., Martorell-Barceló, M., Follana-Berná, G., Lana, A., Campos-Candela, A., & Alós, J. (2021). Performance of a novel system for high-resolution tracking of marine fish societies. *Animal Biotelemetry*, 9(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40317-020-00224-w>
- Blume, C., Santhi, N., & Schabus, M. (2016). «nparACT» package for R: A free software tool for the non-parametric analysis of actigraphy data. *MethodsX*, 3, 430-435. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2016.05.006>
- Borbély, A. A. (1982). Two process model of sleep regulation. *Human Neurobiology*, 1(3), 195-204. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2\\_6166](https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2_6166)
- Candi, G., Castriota, L., Andaloro, F., Finoia, M. G., & Marino, G. (2004). Reproductive cycle and sex inversion in razor fish, a protogynous labrid in the southern Mediterranean Sea. *Journal of Fish Biology*, 64(6), 1498-1513. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2004.0404.x>
- Cardinale, M., Colloca, F., & Ardizzone, G. D. (1998). Growth and reproduction of *Xyrichtys novacula* (Pisces: Labridae) in the Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, 62(3), 193-201. <https://doi.org/10.3989/scimar.1998.62n3193>
- Castriota, L., Scarabello, M. P., Finoia, M. G., Sinopoli, M., & Andaloro, F. (2005). Food and feeding habits of pearly razorfish, *Xyrichtys novacula* (Linnaeus, 1758), in the southern Tyrrhenian Sea: Variation by sex and size. *Environmental Biology of Fishes*, 72(2), 123-133. <https://doi.org/10.1007/s10641-004-6576-0>
- Falcón, J., Besseau, L., Magnanou, E., Herrero, M.-J., Nagai, M., & Boeuf, G. (2011). Melatonin, the time keeper: biosynthesis and effects in fish. *Cybium*, 35(1), 3-18.
- Falcón, J., Besseau, L., Sauzet, S., & Boeuf, G. (2007). Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. En *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 18, Número 2, pp. 81-88). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.01.002>
- Golombek, D., & Yannielli, P. (2006). Organización del sistema circadiano en vertebrados. En J. A. Madrid & M. Á. Rol de Lama (Eds.), *Cronobiología básica y clínica* (pp. 191-224). Editeca Red.
- Gonçalves, B. S. B., Cavalcanti, P. R. A., Tavares, G. R., Campos, T. F., & Araujo, J. F. (2014). Nonparametric methods in actigraphy: An update. *Sleep Science*, 7(3), 158-164. <https://doi.org/10.1016/j.slsci.2014.09.013>
- Halberg, F. (1969). Chronobiology. *Annual Review of Physiology*, 31, 675-726.
- Helm, B., Visser, M. E., Schwartz, W., Kronfeld-Schor, N., Gerkema, M., Piersma, T., & Bloch, G. (2017). Two sides of a coin: Ecological and chronobiological perspectives of timing in the wild. En *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 372, Número 1734). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0246>

- Isorna, E., de Pedro, N., Valenciano, A. I., Alonso-Gómez, Á. L., & Delgado, M. J. (2017). Interplay between the endocrine and circadian systems in fishes. *Journal of Endocrinology*, 232(3), R141-R159. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0330>
- Katsanevakis, S. (2005). Habitat use by the pearly razorfish, *Xyrichtys novacula* (Pisces: Labridae). *Scientia Marina*, 69(2), 223-229. <https://doi.org/10.3989/scimar.2005.69n2223>
- Madrid, J. A., Boujard, T., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2001). Feeding rhythms. En D. F. Houlihan, T. Boujard, & M. Jobling (Eds.), *Food intake in fish* (pp. 189-215). Oxford: Blackwell Science. <http://www>.
- Madrid, J. A., & de Lama, Á. R. (2006). Cronobiología básica y clínica. Editec@ red.
- Madrid, J. A., & Rol de Lama, M. Á. (2015). Ritmos, relojes y relojeros. Una introducción a la Cronobiología. *Eubacteria*, 33, 1-8.
- Maitra, S. K., & Hasan, K. N. (2016). The Role of melatonin as a hormone and an antioxidant in the control of fish reproduction. En *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 7, Número 38). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00038>
- Martorell-Barceló, M., Mulet, J., Sanllehi, J., Signaroli, M., Lana, A., Barcelo-Serra, M., Aspillaga, E., & Alós, J. (2021). Aggressiveness-related behavioural types in the pearly razorfish. *PeerJ*, 9, e10731. <https://doi.org/10.7717/peerj.10731>
- Postolache, T. T., & Raheja, U. K. (2016). Body Rhythms/Biological Clocks. En H. S. Friedman (Ed.), *Encyclopedia of Mental Health* (2.<sup>a</sup> ed., pp. 193-203). Academic Press.
- Reebs, S. (1992). Sleep, Inactivity and Circadian Rhythms in Fish. En M. A. Ali (Ed.), *Rhythms in Fishes* (pp. 127-135). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3042-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3042-8_10)
- Reebs, S. G. (2002). Plasticity of diel and circadian activity rhythms in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 12, 349-371.
- Roenneberg, T., Wirz-Justice, A., & Mellow, M. (2003). Life between clocks: Daily temporal patterns of human chronotypes. *Journal of Biological Rhythms*, 18(1), 80-90. <https://doi.org/10.1177/0748730402239679>
- Saha, S., Singh, K. M., & Gupta, B. B. P. (2019). Melatonin synthesis and clock gene regulation in the pineal organ of teleost fish compared to mammals: Similarities and differences. En *General and Comparative Endocrinology* (Vol. 279, pp. 27-34). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.07.010>
- Santos, A. D. A., López-Olmeda, J. F., Sánchez-Vázquez, F. J., & Fortes-Silva, R. (2016). Synchronization to light and mealtime of the circadian rhythms of self-feeding behavior and locomotor activity of white shrimps (*Litopenaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 199, 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.05.001>
- Vaquer-Sunyer, R., Barrientos, N., Alós, P., & Vivó, T. (2020). Abundancia relativa de raors (*Xyrichtys novacula*). *Informe Mar Balear*.
- Vega, A. (1993). Análisis estadístico en cronobiología. *Psiquis*, 2(6), 139-149.
- Vera, L. M., Cairns, L., Sanchez-Vazquez, F. J., & Migaud, H. (2009). Circadian rhythms of locomotor activity in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Chronobiology International*, 26(4), 666-681. <https://doi.org/10.1080/07420520902926017>
- Zhdanova, I. V. (2006). Sleep in zebrafish. En *Zebrafish* (Vol. 3, Número 2, pp. 215-226). Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.3.215>

Zhdanova, I. V., & Reeb, S. G. (2005). Circadian Rhythms in Fish. En K. Sloman, S. Balshine, & R. Wilson (Eds.), *Fish Physiology: Behaviour and Physiology of Fish, Volume 24* (1.<sup>a</sup> ed., pp. 197-238). Academic Press.