



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

**Efectos de diferentes ritmos de luz-oscuridad
sobre el sistema circadiano endógeno del lacértido
Gallotia galloti.**

Alfonso García Da Vila

Grau de Biologia

Any acadèmic 2018-19

Treball tutelat per Dr. Mourad Akaarir El Ghourri
Departament de Biologia, Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Física, Química

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:
Sistema circadiano, Ritmo endógeno, *Gallotia galloti*

Agradecimientos:

En primer lugar quisiera agradecer a Ana Dunjó y Jaume Coll los cuales han sido de gran ayuda a lo largo de toda la realización del trabajo.

También quisiera agradecer la ayuda del Dr. Mourad Akaarir El Ghourri, por darme las indicaciones necesarias para la realización de este proyecto.

Y por último quisiera dar las gracias a mi familia, y más concretamente a mis padres Yolanda Da Vila Calvar y Alfonso García García, por el apoyo mostrado durante estos 4 años y por ofrecerme la oportunidad de cursar un grado universitario.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCION	3
1.1 CRONOBIOLOGIA Y SU HISTORIA:	3
1.2 RITMOS BIOLÓGICOS:	4
1.3 RITMOS CIRCADIANOS:	5
1.4 ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA CIRCADIANO:	6
1.4.1 SISTEMA CIRCADIANO EN RÉPTILES:	7
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:.....	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS:	9
3.1. ANIMALES:	9
3.2. METODOLOGÍA:	9
3.3. ANÁLISIS DE DATOS:	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
5. DISCUSIÓN FINAL:.....	19
6. CONCLUSIONES	20
7. BIBLIOGRAFÍA:.....	21

RESUMEN

Se pueden definir los ritmos circadianos como adaptaciones específicas de los diversos ciclos presentados por los organismos a las oscilaciones ambientales diarias. Se han presentado evidencias de que la mayor parte de los ritmos estudiados son endógenos, es decir, se mantienen a pesar de la ausencia de señales ambientales.

Pese a su naturaleza endógena, estos ritmos pueden sufrir alteraciones mediante la modificación de las condiciones ambientales.

Con el tiempo se han desarrollado diversas técnicas para el estudio de los diferentes ritmos biológicos y en concreto de los ritmos circadianos. Pese a que se reconoce el ritmo sueño-vigilia como el más estudiado dentro de los ritmos circadianos, este es equiparable al ritmo actividad-inactividad, que se entenderá como la base de este trabajo.

En este proyecto se estudió el comportamiento de una población de 14 individuos de la especie *Gallotia galloti* en diferentes ciclos de luz-oscuridad de 9 días de duración (luz-oscuridad, luz constante y oscuridad constante) mediante el registro de los movimientos de estos por parte de una serie de sensores infrarrojos fotorreceptores situados en cada uno de los laterales de una jaula individual para cada lagarto. Con el objetivo de observar los cambios producidos en el ritmo circadiano de los individuos sometidos a estudio durante los diferentes ciclos con diversas condiciones de iluminación y tener más información sobre el funcionamiento del sistema circadiano en reptiles.

Los resultados obtenidos mostraron variaciones evidentes en el ritmo a medida que se iban aplicando los diferentes períodos de iluminación. Por tanto es posible afirmar que la aplicación de los diferentes ciclos de luz-oscuridad supone cambios significativos en la regulación del ritmo circadiano endógeno del lacértido *Gallotia galloti*.

ABSTRACT

Circadian rhythms can be defined as specific adaptations of the various cycles presented by organisms to daily environmental oscillations. Evidence has been presented that most of the studied rhythms are endogenous, meaning that they are maintained despite the absence of environmental signals.

In spite of their endogenous nature, these rhythms can suffer alterations by means of the modification of the environmental conditions.

Over time a number of techniques have been developed for the study of different biological rhythms and in particular circadian rhythms. Although the sleep-wake rhythm is recognized as the most studied within circadian rhythms, it is comparable to the activity-inactivity rhythm, which will be understood as the basis of this work.

This project will study the behaviour of a population of 14 organisms of the *Gallotia galloti* species in different light-dark cycles of 9 days duration (light-dark, constant light and constant dark) by recording their movements by a series of photoreceptor infrared sensors located on each side of an individual cage for each lizard. With the objective of observing the changes produced in the circadian rhythm of the individuals under study during the different cycles with different lighting conditions and to have more information on the functioning of the circadian system in reptiles.

The results obtained show obvious variations in rhythm as different lighting periods are applied. It can therefore be said that the application of the different light-dark cycles involves significant changes in the regulation of the endogenous circadian rhythm of the lizard *Gallotia galloti*.

1. INTRODUCCION

1.1 CRONOBIOLOGIA Y SU HISTORIA:

Es característico en todos los seres vivos la presencia de cambios rítmicos en su fisiología. Se denomina “ritmos biológicos” a la serie de procesos producidos de una manera periódica y previsible en los en estos organismos vivos [Garaulet et al, 2015].

Pese a que es cierto que la biología y la medicina suelen construirse alrededor del dónde y cómo suceden las cosas, el cuándo es una variable fundamental para comprender el funcionamiento del cuerpo sano, sus trastornos en la enfermedad y los nuevos enfoques en los tratamientos clínicos.

La presencia de estos ritmos periódicos ha sido observada a lo largo de la historia, sobretodo en medicina, ya en la antigua Grecia algunos filósofos y médicos realizaban diferentes diagnósticos o tratamientos en función de la época del año o dependiendo de las horas del día. Esto también es aplicable en la antigua China, donde el concepto del tiempo y la periodicidad es fundamental como se observa en el clásico texto Nei Ching del siglo III a.C. a partir del cual se empezaron a considera a los ritmos biológicos dentro de sus métodos diagnósticos y de tratamiento. Por lo tanto se puede afirmar que todas las civilizaciones antiguas reconocían la importancia de los eventos recurrentes a lo largo de los días o del año [Golombek et al, 2002]. Sin embargo, el primer experimento cronobiológico no tuvo lugar hasta 1729, cuando el astrónomo Jean Jacques D’ortous DeMairan que diseñó un experimento con el objetivo de comprobar el carácter endógeno de los ritmos circadianos en la especie *Mimosa púdica* dejándola en oscuridad continua durante varios días [JJ et al,1729].

Los resultados de dicho experimento pasaron desapercibidos hasta varios años después, cuando se volvió a retomar esta línea de investigación, los experimentos más destacados fueron realizados por los investigadores John Hill, Henri-Louis du Monceau y Johan Gottfried; cuyos resultados decantaron la balanza a favor de la hipótesis de la naturaleza endógena de los ritmos biológicos por los siguientes motivos: se hallaron ritmos con períodos distintos de 24h, se demostró la naturaleza hereditaria de la periodicidad y se excluyeron posibles fuerzas sutiles que pudieran filtrarse en el laboratorio y conducir la ritmicidad.

No fue hasta la primera mitad del siglo XX cuando apareció la “Cronobiología” como nuevo campo de la ciencia [Garaulet et al, 2015]. Pese a que gran parte de estos “relojes biológicos” tienen un origen externo, como puede ser la fotoperiodicidad, las mareas o los ciclos lunares [Aschoff et al, 1958] (ritmos extrínsecos), también se encuentran algunos que son puramente internos y no se encuentran condicionados por ningún factor externo (ritmos intrínsecos), como pueden ser el latido cardíaco o los movimientos respiratorios. Aunque los ritmos biológicos extrínsecos tienen gran influencia externa el científico Julien Joseph Virey rechazaba la idea de que estos son generados exclusivamente por cambios ambientales periódicos y defendía que la estructura temporal del cuerpo no es adquirida, pero es endógena [Reinberg et al, 2001].

Un avance importante fue el descubrimiento realizado por Augustin de Candolle, botánico suizo que tras someter a la planta (*Mimosa púdica*) a condiciones de oscuridad constante descubrió que la planta no presentaba una periodicidad de 24h en el movimiento de sus hojas sino entre 22 y 23h. Esta fue una primera evidencia de lo que hoy en día se conoce como “free-running rythms” [Candolle et al, 1832].

Las abejas tuvieron un papel fundamental en los orígenes de la cronobiología. Ya que en 1920, el naturalista suizo Auguste Forel fue el primero en plantearse la posibilidad de que no solo las plantas, sino también los animales, se regían por estos ritmos biológicos de origen endógeno. Hipótesis que confirmaría tras una serie de estudios realizados sobre las abejas [Forel et al,

1910]. También llevaron a cabo estudios de los que se extrajeron conclusiones trascendentales sobre estos individuos otros investigadores como Ingeborg Beling y Karl von Frisch (que demostraron que estos insectos poseían una especie de “*Zeitgedächtnis*” (memoria del tiempo)) [Beling et al, 1929]. Hallazgo similar al que hizo el biólogo Gustav Kramer que presentó evidencias de la existencia definitiva de un reloj biológico en las aves migratorias [Schmidt-Koenig et al, 1991].

Hacia mediados del siglo XX tuvo lugar la formalización de los mecanismos de los ritmos circadianos por parte de los considerados padres de la cronobiología: Colin Pittendrigh, botánico inglés (trabajó principalmente con pequeños roedores y moscas) y Jürgen Aschoff, médico y biólogo alemán (trabajó con diversas especies de aves y mamíferos, incluyendo humanos). Entre ambos dieron lugar a los dos modelos básicos para explicar el proceso de encarrilamiento (el modelo paramétrico de Aschoff [Aschoff et al, 1960] y el no-paramétrico de Pittendrigh [Pittendrigh et al, 1960]) que son clave en el desarrollo de los ritmos circadianos. Para terminar, se considera que la cronobiología como disciplina científica nació en Cold Spring Harbor, Nueva York, tras el congreso internacional celebrado en 1960.

1.2 RITMOS BIOLÓGICOS:

Se entiende como ritmo biológico toda oscilación cíclica de una variable biológica que se repite en el tiempo a intervalos regulares.

Todos los ritmos biológicos presentan una serie de variables o elementos que los definen: Período (duración de un ciclo completo), Mesor (es la media de todos los valores observados durante un ciclo, indica el rango en que oscila la variable de estudio), Amplitud (diferencia entre el mesor y el valor máximo alcanzado durante un período, expresa la variación), Fase (valor de la variable en un momento determinado; se distinguen dos fases: acrofase (la variable alcanza el valor máximo) y batifase (la variable alcanza el valor mínimo) (Figura 1) [Cardinali et al, 1994].

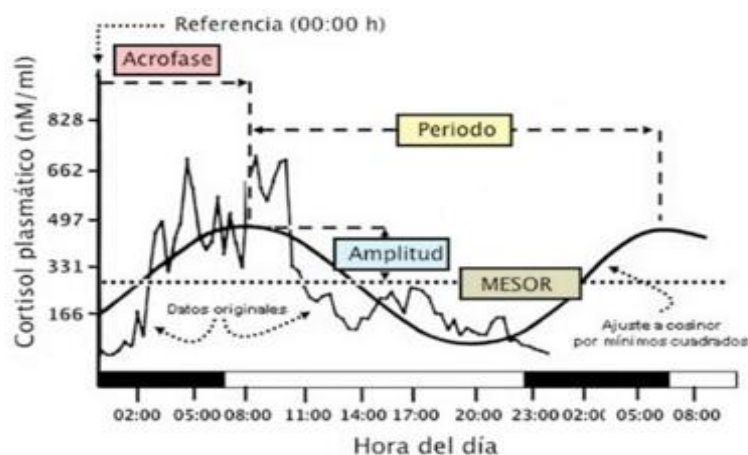


Ilustración 1: Diagrama de ritmos biológicos.

Sin duda, el hecho de adaptarse a un planeta que gira con un período de 24 horas ha condicionado gran parte de estos ritmos biológicos a la presencia de ritmos diarios. Pero no todos los ritmos tienen una base diaria en cronobiología, pese a haber sido menos estudiados también existen investigaciones sobre ritmos estacionales, anuales, mareales o lunares [Aschoff et al, 1963]. Estos ritmos se clasifican de acuerdo con su frecuencia y su periodo (Figura 2): se

denomina “circadianos” a los ritmos que presentan un período próximo a las 24 horas (se comprenden los períodos de entre 20 y 28 horas), “ultradianos” a los que siguen una periodicidad inferior a 20 horas (ciclo del sueño, ritmo cardíaco,...), e “infradianos” a aquellos con períodos mayores a 28 horas (ritmos estacionales, menstruales,...) [Golombek et al, 2002]. Todos los tipos de ritmos coexisten en los distintos niveles de organización biológica. Las características y la periodicidad dependen de las necesidades de cada organismo en cada momento determinado para conseguir la máxima eficiencia biológica [Arderiu et al, 1998].

1.3 RITMOS CIRCADIANOS:

El término “circadiano” (“circa” que en latín significa “alrededor”, y “diem” que significa “día”) fue acuñado por Franz Halberg, biólogo rumano-estadounidense, para referirse a los ritmos que oscilan con una periodicidad aproximada de un día [Halberg et al, 1959].

Todos los seres vivos presentan un reloj circadiano que les ayuda a adaptar sus ciclos de actividad-inactividad a las oscilaciones ambientales diarias [Mailloux et al, 1999]. Basándose en su estado en cada momento, el sistema indica la respuesta adecuada en función del ambiente, ya sea bioquímica, metabólica o conductual. La sincronía lograda entre el metabolismo de un organismo y su entorno proporciona una ventaja de supervivencia [Pittendrigh et al, 1972] que ha estimulado el desarrollo de tales sistemas en la historia evolutiva.

Se puede hablar de tres principales características de los ritmos circadianos: sincronización (permite a los organismos cambiar el período de su ritmo endógeno y adaptarlo al mismo período que el ambiente que los rodea), carácter endógeno (un organismo puede generar ritmos por sí mismo sin necesidad de cambios externos), compensación de los cambios de temperatura [Rol et al, 2006].

Los ritmos circadianos se sincronizan con el ambiente mediante una serie de señales periódicas conocidas como “zeitgebers”. La presencia de estos zeitgebers permite que se establezca y se mantenga una relación de fase estable entre el ambiente y el ritmo endógeno, donde se asegura la correspondencia de ambos [Aschoff et al, 1964]. Sin embargo, se ha demostrado que en ausencia de zeitgebers, cuando el organismo es sometido a condiciones constantes, los ritmos se mantienen, por lo que se puede concluir que estos están regulados por un carácter endógeno [Aschoff et al, 1960]. Cuando ocurre esto se hace referencia a que el ritmo está en curso libre o “free running” y se identifica su período como Tau (τ), que hace referencia a la periodicidad endógena con la que oscila un ritmo en ausencia de sincronizadores. Si se elimina el factor ambiental y el ritmo no entra en curso libre se produce lo que se conoce como enmascaramiento [Cardinali et al, 1994].

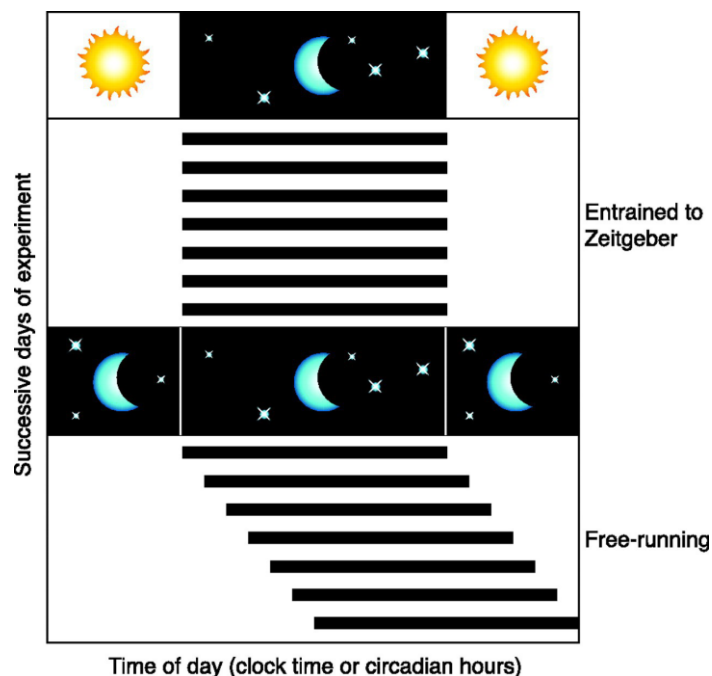


Ilustración 2: Representación del ritmo actividad-inactividad de un animal sincronizado con su zeitgeber mediante ciclos de 24 horas de luz oscuridad, y transferido a condiciones constantes de oscuridad (free-running) [Golombek et al, 2010].

1.4 ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA CIRCADIANO:

Todo sistema circadiano está formado por al menos 3 elementos principales: un marcapasos (reloj biológico), un sincronizador ambiental (zeitgeber) y los ritmos controlados por el reloj [Golombek et al, 2006].

En los vertebrados mamíferos este reloj biológico se encuentra en el núcleo supraquiasmático (NSQ) [Aguilar-Roblero et al, 1998] que está situado en la parte anterior del hipotálamo [Saper et al, 2005].

El NSQ recibe varias señales sensoriales entre las que destaca la señal luminosa que capta desde la retina y que lo activa. Al activarse inhibe la secreción de melatonina. Debido a esto se puede concluir que la melatonina es la hormona encargada de regular el ritmo circadiano ya que durante el día permanecerá inhibida y solo se liberará cuando la retina capte oscuridad y active la glándula pineal [Cagnacci et al, 1992], coincidiendo con las horas de sueño. El fotoperíodo es considerado el sincronizador externo más importante en los ritmos circadianos [Martínez-Nicolás et al, 2011], aunque no es el único, existen otros sincronizadores no fóticos como pueden ser la alimentación o la temperatura.

El ritmo sueño-vigilia es el más estudiado dentro de los ritmos circadianos. La investigación de estos comenzó con los primeros estudios que se realizaron sobre individuos aislados de todas las posibles señales de tiempo que podían afectar al comportamiento rítmico. Denominando a este entorno “time-free environment” o entorno libre de tiempo. Jürgen Aschoff fue pionero en el estudio de los ritmos sueño-vigilia en entornos libres de tiempo [Aschoff, 1964]. Los sujetos de estudio se encontraban aislados de todos los ruidos ambientales e incluso de los campos eléctricos y magnéticos. Inicialmente sólo se registraron las variables de motilidad y temperatura rectal, por lo que ciertamente se hacía referencia a los ritmos de actividad-reposo (considerando que el sueño y la baja actividad son equivalentes, de la misma manera que la actividad y la vigilia [Akaâr, 2007]). En el primer estudio realizado, tras 10 días de aislamiento se reportó un desfase en el período del ritmo de una hora, aumentándolo así a 25 h [Aschoff et al, 1962].

Tanto la luz como su intensidad tienen un papel decisivo en el ciclo sueño-vigilia [Boivin et al, 1994].

1.4.1 SISTEMA CIRCADIANO EN RÉPTILES:

En cambio, en vertebrados no mamíferos el sistema es multioscilar, compuesto por los ojos, la glándula pineal y zonas hipotalámicas que funcionan como homólogas a los NSQ [Underwood et al, 1977].

Muchas especies de reptiles poseen varios fotorreceptores circadianos: una glándula pineal fotorreceptora, un órgano parapineal extracraneal (ojo parietal) y fotorreceptores cerebrales profundos [Grace et al, 1996].

Tras realizar diversos experimentos y observar la capacidad de síntesis de melatonina tanto de la glándula pineal como de los ojos de los lagartos [Joss et al, 1978] además de los efectos del cegamiento y la pinealectomía sobre la ritmicidad circadiana [Underwood et al, 1977], los datos sugieren: o bien la melatonina actúa como un mensajero químico entre elementos del sistema circadiano, o la melatonina ejerce sus efectos principales en la epífisis o los ojos y, a través de enlaces hormonales o neuronales influye al resto del sistema circadiano. En el sistema de lagartos la glándula pineal podría actuar como un dispositivo de acoplamiento o como un marcapasos circadiano maestro [Underwood et al, 1981].

La existencia de ritmos circadianos en réptiles, en concreto en lagartos, no fue confirmada hasta 1957 por Klaus Hoffman [Hoffman, 1957] (67) y posteriormente por Hoffman y Spellberg en 1972, que indicaron la presencia de un ritmo circadiano en la temperatura crítica mínima de *Lacerta sicula* [Spellberg et al, 1972] (68). Años más tarde, Underwood realizó varios estudios sobre la actividad circadiana en varias especies de iguanas y mostró los efectos de algunas manipulaciones experimentales sobre estas [Underwood, 1977, 1981].

El estudio de los ritmos circadianos sobre la especie *Gallotia galloti* no tuvo lugar hasta 1989, cuando Molina-Borja, García-Díaz y Gonzalez-Gonzalez realizaron los primeros estudios [Molina-Borja et al, 1989] y mostraron los efectos de diversas manipulaciones sobre esta [Molina-Borja, 1996].

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

Basándose en algunos de los estudios mencionados anteriormente [Molina-Borja et al, 1986, 1989] se propuso estudiar el efecto de diferentes ciclos de luz-oscuridad (12h luz-12 horas oscuridad, luz continua y oscuridad continua) sobre el ritmo circadiano del lacértido *Gallotia galloti*. Para ello se realizará un registro de la actividad motora de 14 individuos de esta especie durante los diferentes ciclos. Cabe esperar que durante los ciclos en los que se modifican las condiciones habituales de luz-oscuridad y eliminar los sincronizadores externos se produzcan alteraciones en el ritmo circadiano.

Los principales objetivos de este trabajo son:

- Analizar la actividad motora de un grupo de 14 lacértidos de la especie *Gallotia galloti* durante diferentes ritmos de luz-oscuridad.
- Observar el carácter endógeno de los ritmos circadianos y su capacidad de sincronización
- Averiguar el ritmo endógeno mediante el tratamiento de los resultados con herramientas de análisis cronobiológico.

3. MATERIAL Y MÉTODOS:

3.1. ANIMALES:

En cuanto a los animales objeto de estudio se cuenta con 14 individuos de la especie *Gallotia galloti* (lagarto tizón), reptil de la familia *Lacertidae*. Esta especie es endémica de las islas Canarias, principalmente la isla de Tenerife aunque también puede encontrarse en la isla de La Palma. Estos animales han sido capturados y trasladados a la Universidad siguiendo los protocolos legales y garantizando su seguridad, además de contar con la autorización del Gobierno Autónomo Canario.

3.2. METODOLOGÍA:

Una vez que los animales han sido trasladados al laboratorio los lagartos se introducen en jaulas individuales (23 x 21 cm) provistas de 4 sensores de movimiento (uno en cada uno de los laterales de la jaula) conectados a un ordenador que archiva el recuento de los movimientos y colocados a una altura óptima para registrar la mayor cantidad de movimientos que sea posible (Figura 4). Estas jaulas se adecuan previamente introduciendo gravilla y dos placas de Petri que hacen la función de comedero y bebedero, además se cubren con una malla de mosquitera en la parte superior para evitar que se escapen los lagartos. Se deposita cada una de las jaulas en el interior de una cámara que presenta unas condiciones iniciales de 22°C, un 50-60% de humedad relativa, 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Cada 10 días se procede a la alimentación de los individuos mediante potito de frutas y agua.

Tras meter cada uno de los lagartos en su jaula e introducir estas en la cámara se inicia el período de grabación. Los movimientos son registrados por unos sensores infrarrojos fotorreceptores situados en cada uno de los laterales de la jaula. Estos detectan las interrupciones en el haz de luz que se producen cada vez que se realiza un movimiento y transmiten la señal a un digitalizador que la envía al ordenador, donde se crea un archivo que contiene todos los movimientos registrados durante un ciclo. Las interrupciones del haz de luz se miden constantemente usando un equipo transmisor y un software DAS 24 V29, diseñado por el grupo de Cronobiología de la Universidad de Barcelona, que permite observar y guardar los patrones de movimiento de cada jaula para su análisis posterior.

El período de grabación de nuestro experimento es de unos 40 días durante los cuales se somete a los lagartos a diferentes ciclos de luz/oscuridad. Se divide en 4 ciclos de 9 días cada uno durante los cuales se muestrearon intervalos de 5 minutos detectando los movimientos con un intervalo mínimo de 10 ms entre movimientos. Los ciclos son los siguientes:

1. Ciclo de 12 horas de luz (8:00-20:00) y 12 horas de oscuridad (20:00-8:00) (L/O).
2. Ciclo de 24 horas de luz (L/L).
3. Ciclo de 12 horas de luz (8:00-20:00) y 12 horas de oscuridad (20:00-8:00) (L/O).
4. Ciclo de 24 horas de oscuridad (O/O)

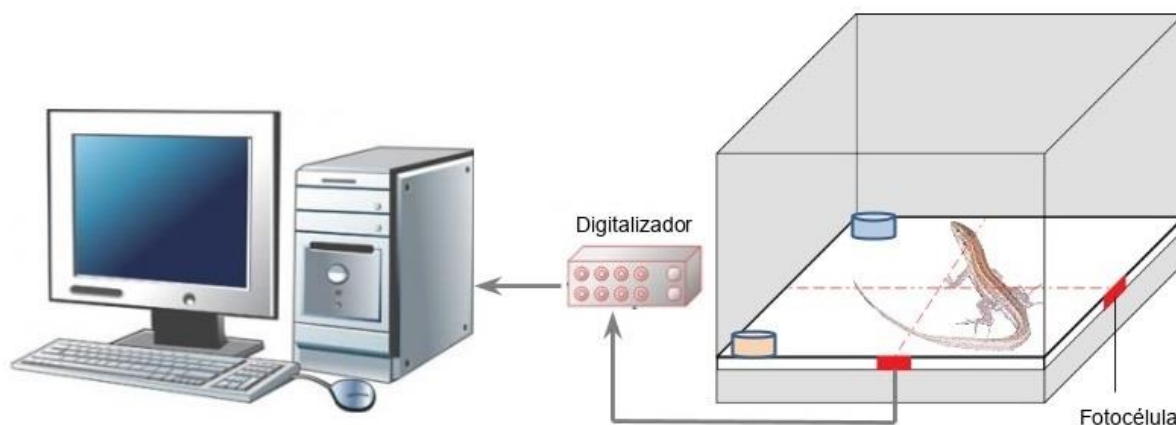


Ilustración 3: Representación de una jaula individual con los sensores infrarrojos fotorreceptores y procesadores que envían la información al ordenador.

3.3. ANÁLISIS DE DATOS:

Para el análisis de los datos rítmicos se requiere una metodología concreta que presenta algunas diferencias en comparación con la estadística convencional. Esta metodología engloba dos procedimientos principales: el método cosinor, que se basa en el ajuste a una función sinusoidal y otro método basado en un análisis no paramétrico [Garaulet et al, 2015].

El análisis cosinor es un procedimiento matemático basado en el ajuste de mínimos cuadrados de una función coseno a los datos originales. A partir del ajuste cosinor se definen tres parámetros principales: mesor, amplitud y acrofase. El mesor es el valor medio del ritmo ajustado a la función sinusoidal. La amplitud es la diferencia entre el mesor y el máximo o el valor mínimo de la función cosenoidal. La acrofase es la localización temporal del valor máximo de la función. Teniendo en cuenta que el ritmo reposo-actividad del ser humano tiene una distribución asimétrica en las 24 horas (alrededor de 8 h reposo vs. 16 h actividad) y una forma que se parece más a una onda cuadrada que un cosinusoide puro, el método cosinor sólo proporciona una descripción aproximada y general del ritmo de reposo-actividad. Sin embargo, es un método relativamente sencillo que proporciona una gran cantidad de información cuantitativa.

Con el objetivo de facilitar una estimación más precisa de los parámetros rítmicos que no muestran una forma de onda simétrica, cada vez se utilizan más los procedimientos no paramétricos. Los parámetros más frecuentes son: la estabilidad interdiaria (ES), cuantifica la regularidad del ritmo, es decir, el grado de semejanza entre los patrones rítmicos en días individuales; la variabilidad intradiaria (VI), determina la fragmentación del ritmo; las 5 horas consecutivas de menor actividad (L5), es el valor mínimo de actividad de una onda media durante 5 horas consecutivas dentro de un día completo de 24 h; las 10 horas consecutivas de mayor actividad (M10), el valor máximo de actividad durante 10 horas consecutivas dentro del ciclo de 24 h; el inicio y punto medio de L5 y M10, proporciona información fiable sobre la fase del ritmo, similar a la proporcionada por la acrofase y el nadir del método cosinor; la amplitud (AMP), es la diferencia entre M10 y L5 y la amplitud relativa (AR), que se calcula dividiendo AMP por la suma de L5 y M10.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La muestra analizada incluye, como se ha explicado anteriormente, 14 individuos de la especie *Gallotia galloti* sometidos a las mismas condiciones indierentemente de su sexo o tamaño. Se realiza un tratamiento de los datos con diversos programas de análisis cronobiológico (OriginPro, Ritmes, Circadian Rythm Laboratory (Plot) y Circadian Rythm Laboratory (Lsp)

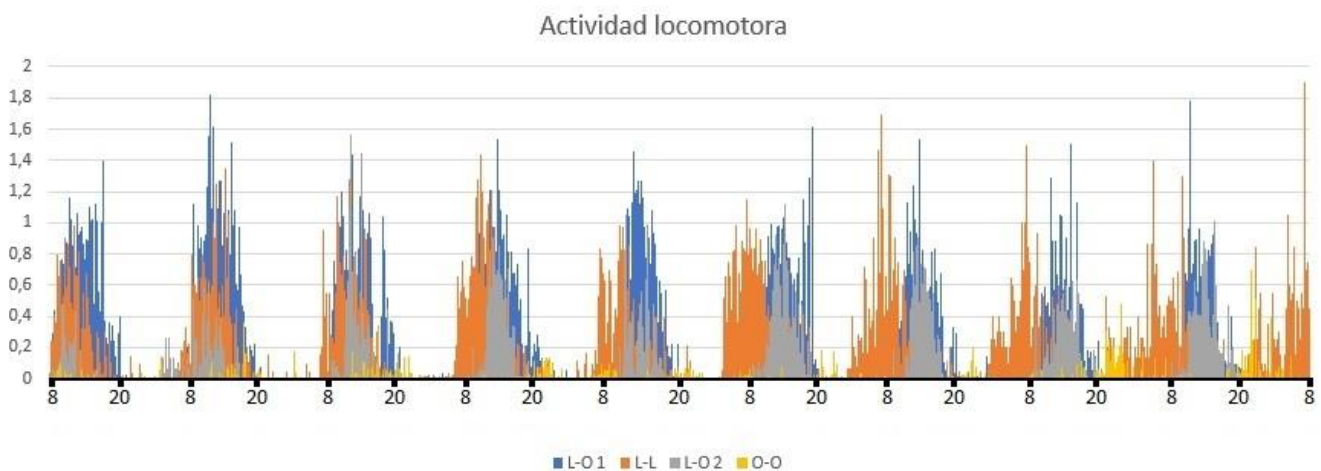


Figura 1: Representación gráfica conjunta de los promedios de la actividad locomotora presentada por los 14 individuos sometidos a estudio durante el transcurso de los 4 diferentes ciclos de luz-oscuridad.

En la figura 1 se representa la actividad locomotora registrada por los individuos sujetos a estudio durante cada uno de los ciclos de luz-oscuridad a los que han sido sometidos durante este experimento (12h luz-12h oscuridad, 24 horas de luz y 24 horas de oscuridad).

Se observa una gran similitud entre los dos ciclos de luz-oscuridad. Mientras que se producen algunas alteraciones en el ritmo durante los ciclos en los que se modifican las condiciones ambientales (ciclo de luz constante y ciclo de oscuridad constante).

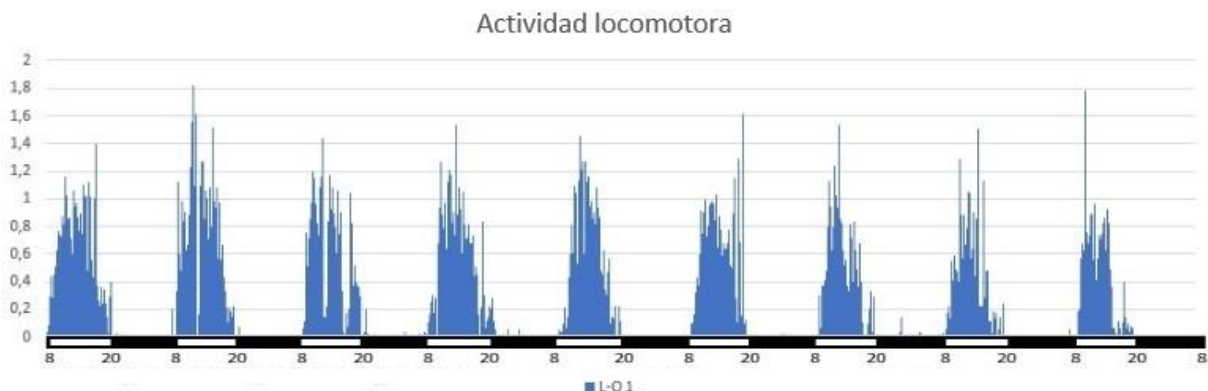


Figura 2: Representación gráfica del promedio de la actividad locomotora presentada por los 14 individuos sometidos a estudio durante el primer ciclo de luz-oscuridad (12h. luz – 12h oscuridad).

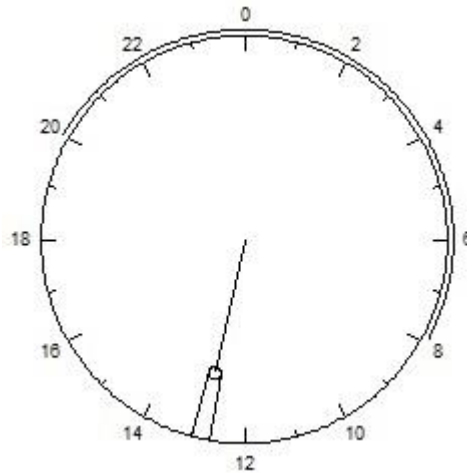


Figura 3: Representación de la prueba del análisis del cosinor realizado sobre los datos obtenidos durante el primer ciclo de luz-oscuridad.

En la figura 2 se representa el promedio de la actividad locomotora registrada para cada lagarto durante los 9 días de duración del primer ciclo de luz-oscuridad (12 horas luz y 12 horas oscuridad), mostrando en el eje X el período de luz (8:00-20:00 marcado en color blanco) y el período de oscuridad (20:00-8:00 marcado en color negro) de cada uno de los días. En la gráfica se observa cómo se sigue un ritmo circadiano muy claro concentrando la actividad durante el período de luz diario, correspondiendo al resultado esperado ya que se trata de animales diurnos. Al tratarse de un ritmo sinusoidal, como se ha explicado anteriormente, se realiza la prueba del análisis de cosinor mediante el programa Ritmes. El análisis del cosinor consiste en determinar la función cosinoidal que más se corresponda con el ritmo. Los principales parámetros rítmicos que permite determinar son: el período, el mesor, la acrofase y la amplitud.

En la figura 3 se ofrece una representación de la prueba de cosinor. Proporcionando un valor de mesor de 0,21. El módulo se corresponde con la amplitud, que presenta un valor de 0,34, por lo que la oscilación de la variable a lo largo del ciclo será bastante pronunciada dado que durante este período toda la actividad registrada tiene lugar durante la fase de luz. En cambio, la orientación del vector, que viene determinada por la acrofase (momento en el que se da el valor máximo), se sitúa a las 12:50, por tanto se puede afirmar que el momento de mayor actividad del ciclo se encuentra muy cerca de la mitad de la fase de luz del ciclo y prácticamente en el extremo opuesto al período de oscuridad.

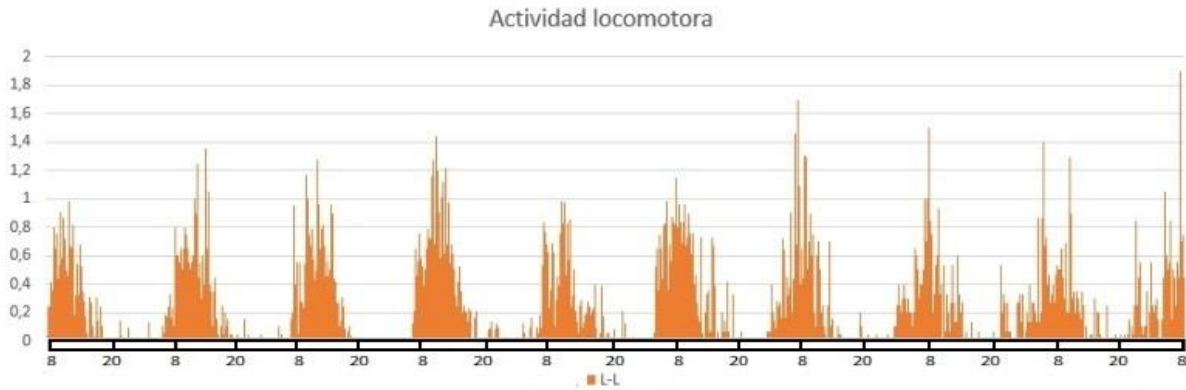


Figura 4: Representación gráfica del promedio de la actividad locomotora presentada por los 14 individuos sometidos a estudio durante ciclo de luz continua (24h. luz).

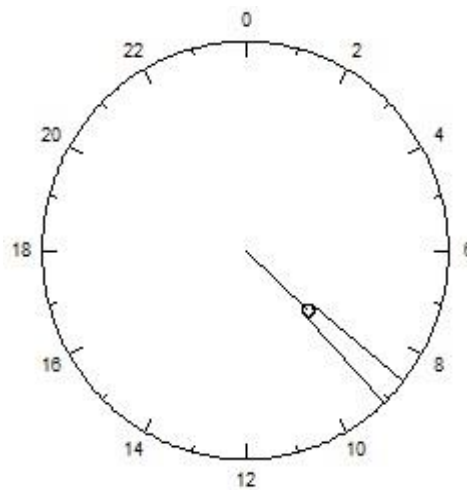


Figura 5: Representación de la prueba del análisis del cosinor realizado sobre los datos obtenidos durante el primer ciclo de luz continua.

La figura 4 de nuevo muestra el promedio de la actividad locomotora registrada para cada lagarto pero en este caso durante los 9 días de duración del ciclo de luz continúa (24 horas de luz). Por lo tanto se puede ver como en el eje de las X ya no aparecen franjas negras y blancas (simulando las fases de luz y oscuridad) sino todas blancas. De nuevo se observa claramente como durante este ciclo se sigue un ritmo de actividad-inactividad. Aunque con la diferencia de que en este caso se aprecia un pequeño adelanto en el ritmo que se va acentuando a medida que van avanzando los días, llegando incluso a observarse una oscilación más que en el ritmo mostrado en la etapa anterior. Al eliminar el sincronizador externo del paso de luz a oscuridad y mantenerse en condiciones constantes de luz el ritmo entra en curso de marcha libre, lo que significa que en este caso no se trata de un ritmo sincronizado con el ambiente externo, sino que es el ritmo endógeno de la población de individuos.

Observando que nuevamente se trata de un ritmo sinusoidal, como en el ciclo anterior, se procede a realizar la prueba de análisis del cosinor.

En la figura 5 se muestra el resultado de la prueba del análisis de cosinor de los datos registrados durante el ciclo de luz constante. Analizando la longitud del módulo se puede observar que la amplitud es bastante inferior que en el anterior ciclo de luz-oscuridad, en este caso el valor es de 0,21. Esto supone una reducción en la oscilación de la variable a lo largo del ciclo, lo que

puede ser debido a que la eliminación de la alternancia de la iluminación tiene como consecuencia un ritmo actividad-inactividad menos pronunciado. Como se ha explicado anteriormente la orientación del vector se corresponde con el valor de la acrofase, que durante este ciclo se sitúa a las 8:50. Valor que se corresponde con la afirmación anterior de que existe un claro adelanto del ritmo. En cuanto al mesor (0,17), también se aprecia una clara disminución en comparación con el ciclo anterior.

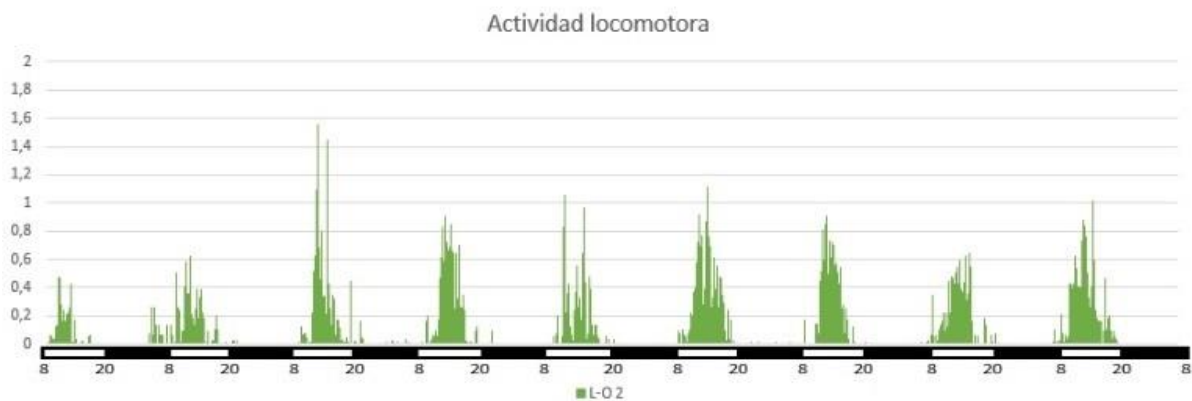


Figura 6: Representación gráfica del promedio de la actividad locomotora presentada por los 14 individuos sometidos a estudio durante el segundo ciclo de luz-oscuridad.

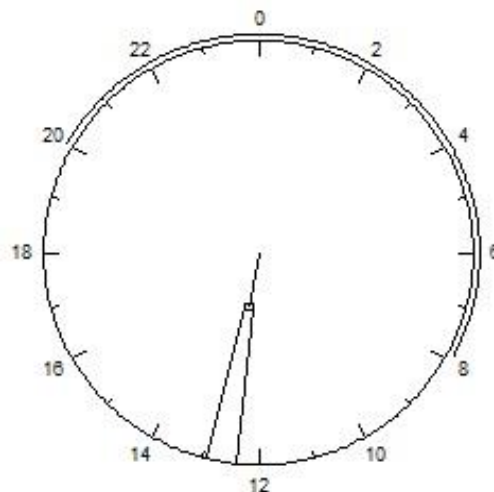


Figura 7: Representación de la prueba del análisis del cosinor realizado sobre los datos obtenidos durante el segundo ciclo de luz-oscuridad.

La figura 6 representa el promedio de la actividad locomotora registrada en la población sujeta a estudio durante un nuevo ciclo de luz-oscuridad (12 horas luz y 12 horas oscuridad). Se puede observar cómo, salvo en los primeros días en los que hay un pequeño período de adaptación al nuevo ciclo, al introducir de nuevo el sincronizador externo vuelve a aparecer un ritmo muy claro en el cual la actividad se concentra durante las fases de luz diarias. Correspondiéndose con los resultados observados en el anterior ciclo de luz-oscuridad.

Al tratarse, una vez más, de un ritmo sinusoidal, se realiza la prueba de análisis del cosinor.

En la figura 7 se muestra la representación obtenida tras realizar la prueba del análisis de cosinor de los datos registrados durante el segundo ciclo de luz-oscuridad.

Analizando la longitud del módulo del vector se puede observar que la amplitud (0,13) es muy inferior a la observada en el anterior ciclo de luz-oscuridad. Lo que supone una importante disminución en la oscilación de la variable entre las fases de actividad-inactividad en contraposición con el anterior ciclo de luz-oscuridad. Sabiendo que la orientación del vector indica la acrofase se aprecia que, como era de esperar, esta tiene un valor muy próximo al calculado en el anterior ciclo homólogo (12:39). En lo referente al mesor también se observa un drástico descenso en comparación con el ciclo anterior resultando en un valor de 0,08.

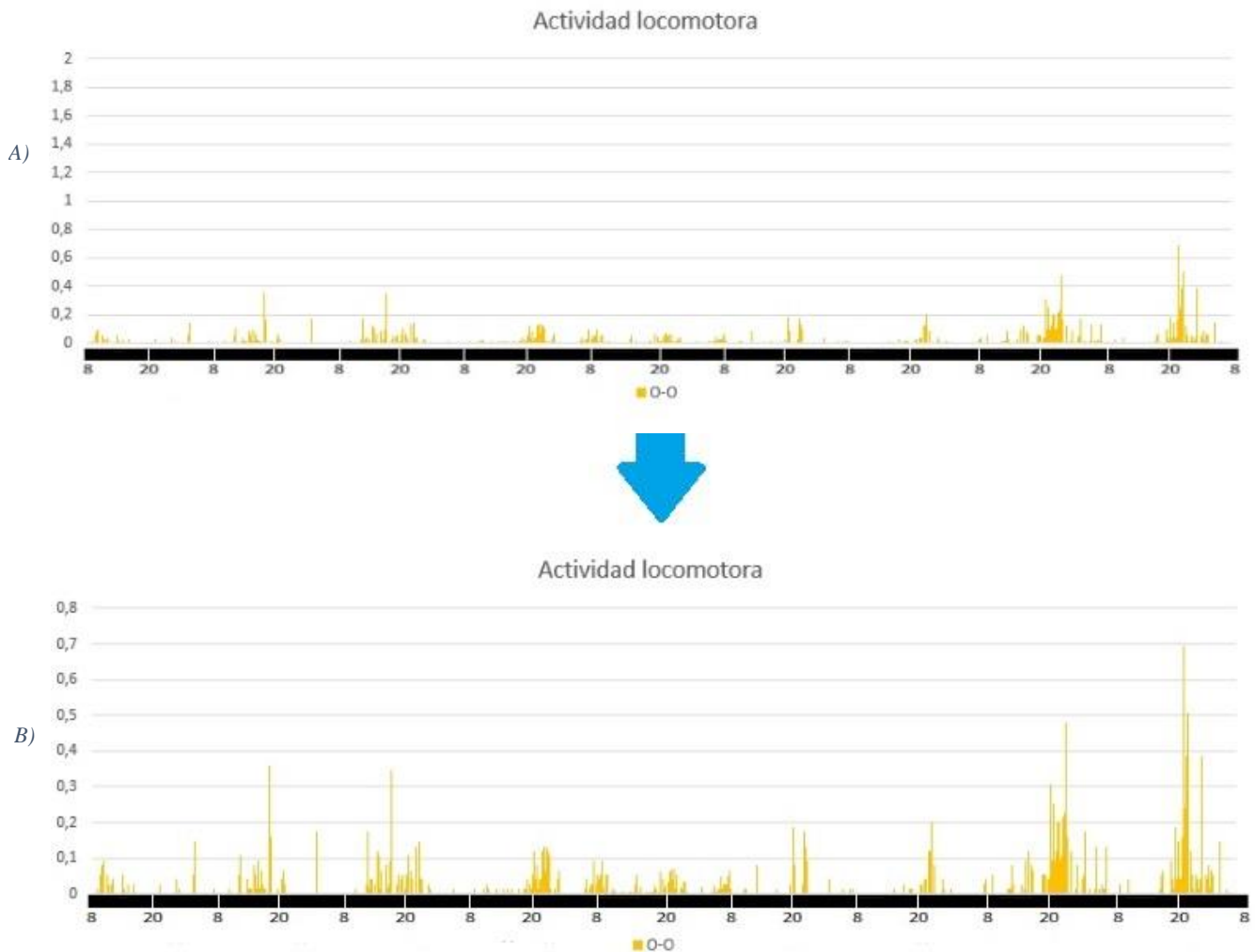


Figura 8: Representación gráfica del promedio de la actividad locomotora presentada por los 14 individuos sometidos a estudio durante el ciclo de oscuridad continua (24h. oscuridad). A) Se utiliza el mismo eje vertical que en las gráficas utilizadas anteriormente. B) Se reduce el eje vertical.

En la figura 8 se muestra la representación del promedio de la actividad motora registrada por los 14 individuos durante los 9 días de duración del ciclo de oscuridad constante (24 horas de oscuridad). Por lo tanto se puede ver como en el eje de las X ya no aparecen franjas negras y blancas (simulando las fases de luz y oscuridad) sino todas negras. Durante este período la actividad locomotora de la población de lagartos disminuye radicalmente, por lo que para poder observar si se sigue alguna especie de ritmo se ha tenido que modificar el eje Y en comparación con las gráficas presentadas anteriormente.

Se puede apreciar un ritmo de muy poca amplitud que parece presentar un pequeño retraso a medida que avanza el ciclo de oscuridad continua. La poca actividad, especialmente en los

primeros días, puede ser debida a que estos animales nunca han sometidos a un periodo de oscuridad tan largo (9 días).

Pese a ser un ritmo de poca amplitud, se trata de un ritmo sinusoidal, por lo que nuevamente se realizó la prueba del análisis de cosinor.

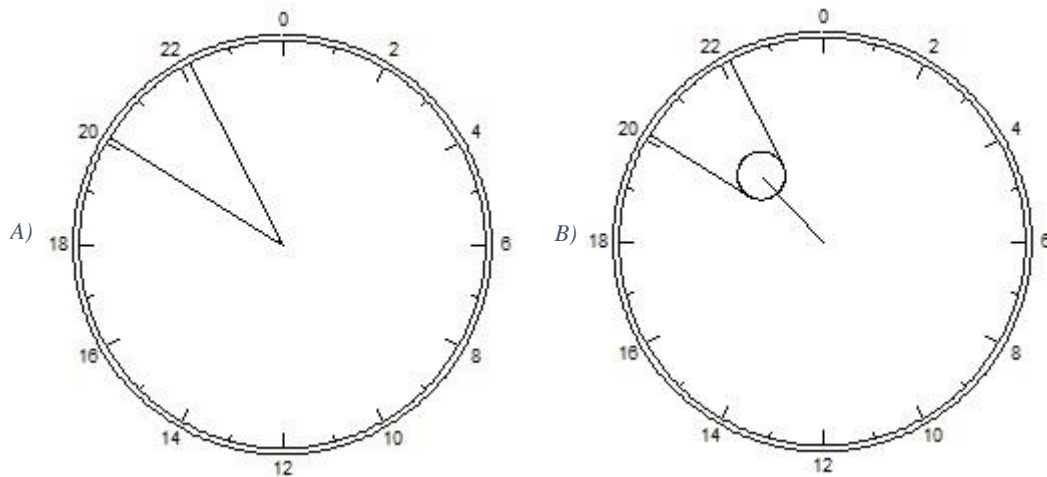


Figura 9: Representación de la prueba del análisis del cosinor realizado sobre los datos obtenidos durante el primer ciclo de oscuridad continua. A) Se utiliza el mismo radio que en los ciclos presentados anteriormente. B) Se reduce el radio.

La figura 9 ofrece una representación de la prueba del cosinor. Se puede apreciar a simple vista como el resultado de este análisis del cosinor difiere en gran parte con las pruebas realizadas en los ciclos presentados anteriormente. Prácticamente no se observa el módulo, sabiendo que este se corresponde con la amplitud se espera un valor muy bajo de esta (0,01). Esto se corresponde con lo esperado ya que al presentar una actividad tan baja la oscilación de la variable ha de ser muy pequeña. Igual que el valor del mesor (0,01), también se corresponde con esta reducción en la actividad. La acrofase se encuentra completamente desplazada en relación con los ciclos presentados anteriormente, produciéndose a las 21:08.

Con el objetivo de comparar la variación de los ritmos observados durante los diferentes ciclos de luz-oscuridad, mediante el programa Circadian Rythm Laboratory (Plot), se realiza un actograma conjunto donde se representa la actividad registrada durante los diferentes ciclos, uno debajo del otro, en la misma escala de tiempo (figura 10). Un actograma es una representación de la actividad locomotora de uno o varios individuos en una escala de tiempo.

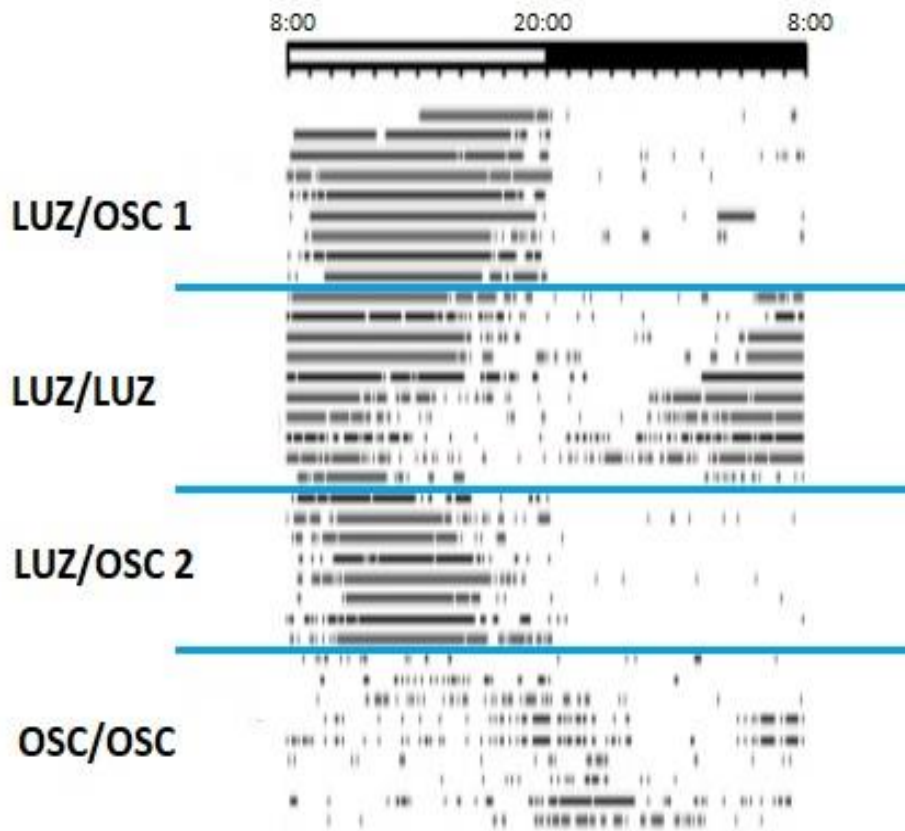


Figura 10: Actograma conjunto de los resultados obtenidos durante el transcurso de los 4 diferentes ciclos de luz-oscuridad.

En la figura 10 se puede apreciar con facilidad los cambios que sufre el ritmo de actividad-inactividad a medida que van avanzando los días de los diversos ciclos de luz-oscuridad. Se puede ver como durante el primer ciclo de luz-oscuridad se sigue un ritmo muy definido, manteniendo la actividad durante la fase de luz. Durante el período de luz continua se puede observar como se produce un adelanto que se va acumulando a medida que van pasando los días del ciclo. Al volver a someter a los individuos a un nuevo ciclo de luz-oscuridad estos empiezan a recuperar el ritmo presentado durante el primer ciclo homólogo tras un pequeño período de readaptación. Y por último, durante el último ciclo de oscuridad constante prácticamente no se aprecia ningún ritmo ya que este es muy difuso y la actividad es muy baja.

Para poder analizar más concretamente el adelanto observado en el ritmo durante el ciclo de luz constante. Se realiza el actograma únicamente de este ciclo (Figura 11.A). En la figura

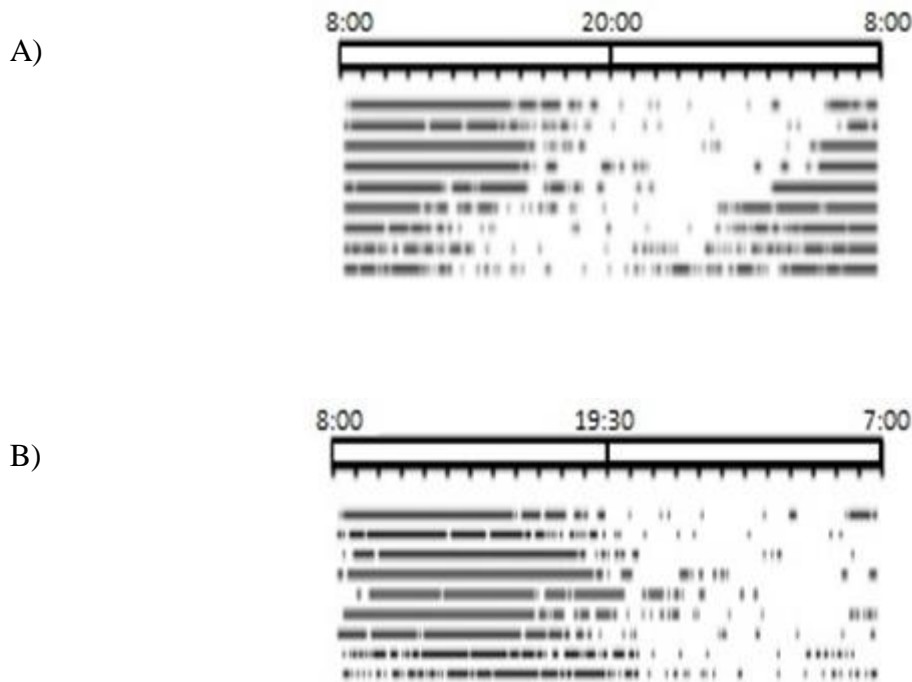


Figura 11: A) Actograma de los resultados obtenidos durante el ciclo de luz constante. B) Actograma de los resultados obtenidos durante el ciclo de luz constante adaptando la escala a 23 horas.

En la figura 11.A. se puede apreciar el ritmo endógeno presentado por la población de individuos. Como se había observado anteriormente, se ve un claro adelanto en el ritmo a medida que va avanzando el ciclo. A raíz de este adelanto se puede deducir que el ritmo endógeno de la población de individuos sometida a estudio es inferior a 24 horas.

Para poder calcular el “tau” (t), o período de un ritmo en curso libre, se utiliza el programa Circadian Rythm Laboratory (Lsp). Obteniendo como resultado que el ritmo endógeno de esta población en condiciones de luz constante es de $t = 23,3$ horas. Confirmando, como se había dicho previamente que el período del ritmo endógeno es inferior a 24 horas.

Como se ha observado en la figura 8, el ritmo endógeno presentado durante el período de oscuridad continua también parece sufrir un pequeño desfase, por lo que se utiliza el mismo programa para calcular el t . Obteniendo como resultado que el ritmo endógeno de esta población en condiciones de oscuridad constante es de $t = 25$ horas. Confirmando un retraso en el ritmo.

Con el objetivo de comprobar que efectivamente el ritmo endógeno calculado se corresponde con el período obtenido se ha realizado un nuevo actograma reduciendo en este caso la escala temporal de 24 a 23 horas (Figura 11.B).

Se puede apreciar claramente en la figura 11.B como al reducir la escala temporal haciéndola coincidir con el valor de t obtenido se produce una regulación del ritmo, coincidiendo prácticamente toda la actividad en la misma franja de la escala temporal.

5. DISCUSIÓN FINAL:

No cabe duda de que la alternancia luz-oscuridad es el principal de los ciclos ambientales con periodicidad diaria y por lo tanto el principal sincronizador de los ritmos circadianos. Por lo tanto cabe esperar que la alteración de este parámetro provoque algunas modificaciones en el ritmo endógeno de los individuos a estudiar [Golombek et al, 2006].

Como era de esperar, se detecta un ritmo de actividad de cerca de 24 horas ($t=24,15h$) durante el primer período de luz-oscuridad. La existencia de este ritmo en condiciones constantes de temperatura ya había sido reportada anteriormente en la especie *Gallotia galloti* en diversos estudios [Molina-Borja et al, 1986].

Durante el período de luz constante se puede apreciar como se manifiesta un ritmo endógeno. Correspondiéndose con diversos estudios previos en los que ya se había reparado en la existencia de un ritmo de naturaleza endógena en iguanas y lacértidos [Hoffman,1957; Underwood et al, 1983] y más concretamente en individuos de la especie *Gallotia galloti* [Molina-Borja et al, 1989].

Al calcular el período del ritmo endógeno este resulta ser inferior a 24 horas ($t=23,3h$) como es habitual en los animales diurnos que siguen las reglas circadianas de Aschoff. Aunque el concepto de que en los animales diurnos el período debe ser inferior a 24 horas en condiciones de luz constante y superior a 24 horas en condiciones de oscuridad constante no tiene porque ser generalizado [Aschoff, 1960]. Se ha demostrado que el período del ritmo circadiano endógeno, al menos en condiciones de luz constante, depende de la especie considerada, puesto que Underwood encontró períodos superiores a 24 horas en lagartos del género *Anolis* [Underwood et al, 1983] y períodos inferiores a 24 horas en *Sceloporus occidentalis* [Underwood et al, 1985]. Mediante la prueba del análisis del cosinor se ha observado como durante este ciclo de luz continua el ritmo sufre una reducción de su amplitud, presentando una oscilación menos pronunciada de la variable, como se reporta en un estudio previo realizado sobre *Mabuya quinquetaeniata* y *Tarentola annularis* [Constantinou et al, 1985].

Al terminar el período de luz continua y volver a un nuevo ciclo de luz-oscuridad se puede observar como todos los individuos vuelven a recuperar el ritmo presentado durante el primer ciclo de luz-oscuridad, después de unos primeros días, durante los que sufren un pequeño período de adaptación, que se caracterizan por un cambio de fase transitorio al cambiar las condiciones [Underwood, 1981].

Por último, durante el período de oscuridad constante se aprecia una clara reducción de la actividad locomotora por parte de todos los individuos. Esto dificulta la apreciación de un ritmo en concreto. Se puede percibir un leve ritmo muy difuso que se va regularizando a medida que avanzan los días del ciclo, la existencia de un ritmo endógeno en condiciones de oscuridad continua ya se había reportado previamente en la especie *Gallotia galloti* [Molina-Borja, 1996]. Al calcular el período de este ritmo endógeno, resulta ser superior a 24 horas ($t=25h$) nuevamente siguiendo las reglas circadianas de Aschoff, en las que se indica que un animal diurno sometido a un período de oscuridad constante presentará un ritmo endógeno superior a 24 horas [Aschoff, 1960].

Tanto la baja actividad locomotora como la poca claridad del ritmo, sobre todo los primeros días del ciclo, se pueden justificar argumentando que estos animales nunca habían sido sometidos a un período de oscuridad constante tan duradero. De hecho se puede apreciar claramente como, tras un período de adaptación, durante los últimos días de este ciclo aumenta la actividad locomotora y empieza a vislumbrarse un ritmo más definido.

6. CONCLUSIONES

Se pueden alcanzar diversas conclusiones a partir de los resultados obtenidos durante este estudio:

1. La alternancia de iluminación de los ciclos luz-oscuridad, afectan claramente al ritmo mostrado produciendo un enmascaramiento.
2. Durante el período de luz continua aparece un ritmo endógeno que presenta un adelanto de fase con respecto al ritmo sincronizado con el ambiente.
3. En el período de oscuridad constante se manifiesta un ritmo endógeno muy débil, presentando una amplitud muy inferior a los ciclos observados anteriormente. Se mantiene un ritmo pero sufre un retraso de fase con respecto al ritmo de 24 horas.
4. Mediante el programa Circadian Rythm Laboratory (Lsp) se calcula el t de los ritmos endógenos observados. Luz continua $t=23,3$ horas. Oscuridad continua $t=25$ horas.

7. BIBLIOGRAFÍA:

1. A. Mailloux, C. Benstaali, A. Bogdan, A. Auzéby, Y. Touitou. 1999. Body temperature and locomotor activity as marker rhythms of aging of the circadian system in rodents. *Experimental Gerontology* 34: 733–740.
2. Aschoff, J. 1964. Circadian rhythms in man. *Science* 148: 1427-143
3. Akaârir, M. (2007). Signos Electrofisiológicos de los estados de reposo, sueño y vigilia. Estudio comparativo entre mamíferos y reptiles. Tesis Doctoral, Universitat de les Illes Balears.
4. Underwood, H. (1981). Circadian organization in the lizard *Sceloporus occidentalis*: the effects of pinealectomy, blinding, and melatonin. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 141(4), 537-547.
5. Marta Garaulet Aza. (07/2015). LA CRONOBIOLOGÍA, LA ALIMENTACIÓN Y LA SALUD. *Mediterráneo Económico*, 27, 101-122.
6. Aschoff, J., Z. Tierpsychol. , 15, 1-30 (1958)
7. Reinberg, A. E., Lewy, H., & Smolensky, M. (2001). THE BIRTH OF CHRONOBIOLOGY: JULIEN JOSEPH VIREY 1814. *Chronobiology International*, 18(2)
8. Aschoff, J. (1963). Comparative Physiology: Diurnal Rhythms. *Annual Review of Physiology*, 25(1), 581–600.
9. Zhao, J., Warman, G. R., & Cheeseman, J. F. (2019). The functional changes of the circadian system organization in aging.
10. J.A. Madrid, G. Pin Arboledas, M.C. Ferrández Gomariz. (2018). Organización funcional del sistema circadiano humano. Desarrollo del ritmo circadiano en el niño. Alteraciones del ritmo vigilia-sueño. Síndrome de retraso de fase. *Pediatría integral*, XXII (8), 385–395.
11. Aschoff, J. (1960). Exogenous and Endogenous Components in Circadian Rhythms. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 25(0), 11–28.
12. Golombek, D. A., & Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of Circadian Entrainment. *Physiological Reviews*, 90(3), 1063–1102.
14. Golombek D. La máquina del tiempo. En: Golombek D, compilador. *Cronobiología Humana: Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad*. Argentina: Universidad Nacional de Quilmes 2002: 21-31.
15. JJ,D.O.D. (1972): «Observation botanique»; *Histoire de L'Académie Royale des Sciences*; pp. 35-6
16. De Mairan, JJO. *Observation Botanique*. *Histoire de l'Académie Royale des Sciences*, Paris; 1729; pp 35-36.

17. Candolle de AP. *Physiologie Végétale*. Paris: Béchet Jeune; 1832
18. Auguste Forel. (1910). *Das Sinnesleben der Insekten: eine Sammlung von experimentellen und kritischen Studien über Insektenpsychologie*. München: Reinhard.
19. Ingeborg Beling. (June 1929). Über das Zeitgedächtnis der Bienen. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 9, 259–338.
20. Schmidt-Koenig, K & Ganzhorn, Jörg & Ranvaud, Ronald. (1991). Orientation in birds. The sun compass. *EXS*. 60. 1-15.
21. Aschoff J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*. 1960; 25: 11–28.
22. Pittendrigh CS. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*. 1960; 25: 159-182.
23. Halberg F, Halberg E, Barnum CP, Bittner JJ. Physiologic 24-hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routine. En: Withrow RB (ed), *Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals*. Washington DC: AAAS 1959; 55: 803–878.
24. Pittendrigh CS, Minis DH. Circadian systems: longevity as a function of circadian resonance in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972;69:1537-9
25. X. Fuentes Arderiu, M. J. Castiñeiras, J. M. Queraltó. (1998). *Bioquímica clínica y patología molecular*. II. Barcelona: Reverté.
26. Juan Antonio Madrid & Angeles Rol de Lama. (2006). *Cronobiología básica y clínica*. España: Editorial: red.
27. D. P. Cardinali, Mari Paz Jordá, Emilio José Sánchez Barceló. (1994). *Introducción a la cronobiología, fisiología de los ritmos biológicos*. Universidad de Cantabria: Santander : Caja Cantabria.
28. Tosini, G., & Menaker, M. (1998). Multioscillatory Circadian Organization in a Vertebrate, *Iguana iguana*. *The Journal of Neuroscience*, 18(3), 1105–1114.
29. Grace MS, Alones V, Menaker M, Foster RG (1996) Light perception in the vertebrate brain: an ultrastructural analysis of opsin- and vasoactive intestinal polypeptide immunoreactive neurons in iguanid lizards. *J Comp Neurol* 367:575–594.
30. Saper, C. B., Scammell, T. E., Lu, J. 2005. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*. 437: 1257-1263
31. Cagnacci A, Elliot JA, Yen SS. (1992). “Melatonin: a major regulator of the circadian rhythm of core temperatura”. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 75(2): 447-452.

32. Martínez-Nicolás A, Ortiz-Tudela E, Madrid JA, Rol MA. (2011). “Crosstalk Between Environmental Light and Internal Time in Humans”. *Chronobiology International*, 28(7): 617-629.
33. Golombek DA, Yannielli PC. Organización del sistema circadiano en vertebrados. En: Madrid JA y Rol de LamaMA, editores. *Cronobiología Básica y Clínica*. Madrid; Editec @Red SL; 2006. p. 191-222
34. Aguilar-Roblero, R, Escandón-Calderón, J., Salazar-Juárez, A., Caldelas, I., Granados-Fuentes, D., Escobar, C. 1998. Phase relations between host and grafted scn depend on graft location in rats. *Biol. Rhythm Res.*, 29(5):521-9
35. Underwood H (1977) Circadian organization in lizards: The role of the pineal organ. *Science* 195:587 589
36. Joss JMP (1978) A rhythm in hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) activity in the scincid lizard, *Lampropholis quichenoti*. *Gen Comp Endocrinol* 36:521 525
37. Garaulet M, Madrid JA. Chronobiology: Influences on metabolic syndrome and cardiovascular risk. *Curr Cardio Risk Rep.* 2010;4:15–23.
38. Ortiz-Tudela, E., Bonmatí-Carrión, M. de los Á., De la Fuente, M., & Mendiola, P. (2012). La cronodisrupción como causa de envejecimiento. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 47(4), 168–173.
39. Weng S, Wong KY, Berson DM. Circadian modulation of melanopsin-driven light response in rat ganglion-cell photoreceptors. *J Biol Rhythms.* 2009;24: 391–402.
40. Stevens RG. Circadian disruption and breast cancer: from melatonin to clock genes. *Epidemiology.* 2005;16:254–8.
41. Haus E, Smolensky M. Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes Control.* 2006;17:489–500.
42. Wu YH, Zhou JN, Van Heerikhuize J, Jockers R, Swaab DF. Decreased MT1 melatonin receptor expression in the suprachiasmatic nucleus in aging and Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging.* 2007;28:1239–47.
43. Davis FC, Viswanathan N. The effect of transplanting one or two suprachiasmatic nuclei on the period of the restored rhythm. *J Biol Rhythms.* 1996;11: 291–301.
44. Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol.* 1991;79:153–8.
45. Van Someren EJ, Riemersma-Van der Lek RF. Live to the rhythm, slave to the rhythm. *Sleep Med Rev.* 2007;11:84.
46. Flanigan, Jr. W.F., 1973. “Sleep and Wakefulness in Iguanid Lizards, *Ctenosaura pectinata* and *Iguana iguana*”. Sleep Laboratory, University of Chicago, Chicago, Ill.

47. Tirapu-Ustárrroz, J. (2012). Neuropsicología de los sueños. revista de Neurología, 55, 101-10. Varvogli, L. y Darviri, C. (2011). Stress Management Techniques: evidencebased procedures that reduce stress and promote health. Health Science Journal, 5 (2), 74-89.
48. Carlson, N, (2014). Fisiología de la conducta. Universidad de Massachusetts: Editorial Pearson.
49. Aschoff J, Wever R. 1962. Spotanperiodik des Menschen bei Ausschluss aller Zeitgeber. Naturwissenschaften 49:337-42.
50. Boivin DB, Duffy J, Kronauer RE, Czeisler CA. 1994. Sensitivity of the human circadian pacemaker to moderately bright light. J. Biol. Rhythms 9:315-31 Boivin DB, Duffy JF, K
51. Hoffmann, K. (1957). Über den Einfluss der Temperatur auf die Tagesperiodik bei einem Poikilothermen. Naturwissenschaften, 44: 358.
52. Spellerberg, I.F., and Hoffmann, K. (1972). Circadian rhythm in lizard critical minimum temperature. Die Naturwissenschaften, 11: 517-518.
53. Garcia-Diaz, C., Molina-Borja, M., & Gonzalez-Gonzalez, J. (1989). Circadian rhythm and ultradian oscillations in the motor activity of the lacertid lizard *Gallotia galloti* in continuous light. Journal of Interdisciplinary Cycle Research, 20(2), 97-105.
54. Molina-Borja, M., González, J. G., Soutullo, T. G., & Díaz, C. G. (1986). 24-H entrainment and ultradian fluctuations in the activity of the lizard *Gallotia galloti* (sauria-lacertidae). Journal of Interdisciplinary Cycle Research, 17(4), 295-305.
55. Miguel Molina-Borja. (1996). Pineal gland and circadian locomotor activity rhythm in the lacertid *Gallotia galloti eisentrauti*: Pinealectomy induces arrhythmicity. Biological rhythm research, Vol. 27, 1-11
56. Marta Garaulet, Purificación Gómez-Abellán, Juan Antonio Madrid. (27/10/15). Métodos cronobiológicos en las encuestas alimentarias: criterios de aplicación e interpretación de resultados. Revista Española de Nutrición Comunitaria, 21, 277-287.
57. Underwood, H. and Harless, M. (1985). Entrainment of the circadian activity rhythm of a lizard to melatonin injections. Physiol. Behav., 35: 267-270.
58. Constantinou, C. and Cloudsley-Thompson, J.L.. (1985). The circadian rhythm of locomotory activity in the desert lizard *Acanthodactylus schmidti*. Journal of Interdisciplinary Cycle Research, 16, 107-111.