



**Universitat**  
de les Illes Balears

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Estudio del efecto de la oclusión del ojo parietal  
sobre el ritmo de actividad-reposo del lacértido  
*Gallotia galloti*

Jaume Coll Ferragut

**Máster Universitario en Neurociencias**

Curso Académico 2019/20

Trabajo tutelado por Mourad Akaârîr El Ghourri

Departamento de Biología

# Índice

<b>Resumen</b> .....	2
<b>Abstract</b> .....	3
<b>1. Introducción</b> .....	4
<b>1.1. Ritmos biológicos</b> .....	4
1.1.1. Características de los ritmos circadianos.....	5
1.1.2. Ritmo sueño-vigilia.....	6
<b>1.2. Organización del sistema circadiano</b> .....	7
<b>2. Objetivos e hipótesis</b> .....	14
<b>3. Metodología experimental</b> .....	15
<b>3.1. Animales</b> .....	15
<b>3.2. Registro de la actividad locomotora</b> .....	15
<b>3.3. Oclusión del ojo parietal</b> .....	16
<b>3.4. Análisis de datos</b> .....	17
<b>4. Resultados</b> .....	20
<b>4.1 Actividad locomotora en curso libre y encarrilamiento a ciclos de luz oscuridad ambiental</b> .....	20
<b>4.2 Determinación y comparación de parámetros cronobiológicos</b> .....	21
<b>4.3 Cálculo del periodo en curso libre</b> .....	24
<b>5. Discusión</b> .....	26
<b>6. Conclusiones</b> .....	28
<b>7. Bibliografía</b> .....	29
<b>8. Agradecimientos</b> .....	32

# Resumen

El ojo parietal es un órgano fotorreceptor asociado con la glándula pineal implicado en la regulación de distintos procesos fisiológicos, como por ejemplo los ritmos circadianos. Se ha demostrado que, a través de la pinealectomía, se producen cambios marcados en los períodos de curso libre o arritmicidad de los ritmos de actividad-reposo en distintas especies de lagartos. La hipótesis de este estudio se basa en el efecto de que, al cubrir el ojo parietal de lagartos de la especie *Gallotia galloti*, se bloquearía la llegada de la estimulación lumínica ambiental a la glándula pineal, lo que provocaría un desajuste pronunciado en el ritmo actividad-reposo. En caso contrario, habría que considerar que hay otra u otras vías que sincronizan el ritmo actividad-inactividad en esta especie. Entonces, el objetivo principal de este trabajo es comprobar, sin proceder a una pinealectomía, la función del órgano pineal en la regulación del ritmo circadiano de actividad-reposo del lacértido *Gallotia galloti*. Para ello, se registró la actividad locomotora de 11 individuos de la especie *Gallotia galloti* con el ojo parietal intacto en tres ciclos diferentes de luz (L) Oscuridad (O): LO 12/12, LO 24/0 y LO 12/12. Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento, pero esta vez tapando el órgano parietal del animal. Para el análisis de datos, determinación y comparación de parámetros cronobiológicos se utilizaron actogramas, el método Cosinor, la técnica del periodograma y la prueba t para datos emparejados. Los resultados obtenidos nos indican que los animales son capaces de mantener un ritmo endógeno con el ojo parietal tapado y que los parámetros cronobiológicos no se ven alterados, lo que sugiere que la glándula pineal presenta otras vías de señalización lumínica aparte del ojo parietal y que, este, parece tener una implicación mínima en la regulación de los ritmos de actividad locomotora en el lacértido *Gallotia galloti*.

# Abstract

The parietal eye is a photoreceptor organ associated with the pineal gland and is involved in the regulation of various physiological processes, such as circadian rhythms. It has been shown that, through pinealectomy, arrhythmicity or marked changes are induced in the endogenous rhythm of activity-resting rhythms in different species of lizards. The hypothesis of this study is based on the effect that, when covering the parietal eye of lizards of the *Gallotia galloti* species, the arrival of environmental light stimulation to the pineal gland would be blocked, which would cause a pronounced maladjustment in the activity-inactivity rhythm. Otherwise, it should be considered that there are other pathways that synchronize the activity-inactivity rhythm in this species. The main objective of this work is to verify, without proceeding with a pinealectomy, the function of the pineal organ in the regulation of the activity-inactivity circadian rhythm of the *Gallotia galloti* lacertid. Therefore, the locomotive activity of 11 individuals of the *Gallotia galloti* species was recorded with the parietal eye intact in three different light cycles (L) Darkness (O): LO 12/12, LO 24/0 and LO 12/12. Subsequently, the same procedure was carried out, but this time covering the animals' parietal organ. For the data analysis, determination and comparison of chronobiological parameters, actograms, the Cosinor method, the peridogram technique and the t-test for paired data were used. The results obtained indicate that the animals are capable of maintaining an endogenous rhythm with the parietal eye covered and that the chronobiological parameters are not altered, suggesting that the pineal gland has other light signaling pathways besides the parietal eye and that this structure is not involved in the regulation of locomotive activity rhythms.

# 1. Introducción

---

## 1.1. Ritmos biológicos

Por definición, un ritmo es un cambio en una variable que se repite con un patrón similar. Los seres vivos tienen la capacidad de regular su medio interno y sus relaciones con el exterior. Esta capacidad de regulación implica, en muchos casos, mecanismos de retroalimentación negativa. Ello conlleva a la generación de oscilaciones o ritmos, ya que siempre hay un tiempo de demora en la actuación de los elementos que constituyen el bucle de retroalimentación. Los ritmos son, entonces, un fenómeno inherente a la vida (Menaker, 2002; Koukkari y Sothorn, 2006).

Además, la evolución ha potenciado algunas de estas oscilaciones y ha ajustado sus periodos para que coincidan con los periodos de determinados eventos astronómicos, responsables de los cambios medioambientales cíclicos en la Tierra. El fenómeno natural más generalizado, causado por la rotación de la tierra sobre su eje, es el día y la noche, aunque hay muchos otros eventos periódicos en la naturaleza, como por ejemplo las estaciones, el ciclo lunar o el ciclo de las mareas (Pati, 2001; Menaker, 2002).

La Cronobiología (del griego *kronos*, tiempo; *bios*, vida; y *logos*, conocimiento) es la disciplina científica que estudia los cambios rítmicos que se producen en los seres vivos (Madrid, 2006), entendiéndose tales cambios como cambios periódicos y previsibles en una variable biológica. Estos ritmos biológicos pueden distinguirse o clasificarse en referencia a su período (Tabla 1).

La presencia de estos ritmos biológicos implica la existencia de mecanismos medidores de tiempo en los seres vivos. Estos mecanismos son los denominados “relojes biológicos”.

**Tabla 1:** Ejemplos de ritmos biológicos atendiendo a su período.

Ritmo	Período	Ejemplo	Referencia
Ultradiano	<20 h	Actividad EEG en <i>Homo sapiens</i>	Krippke, 1972
Circadiano	20 - 28h (aprox. 24 h)	Temperatura corporal en <i>Homo sapiens</i>	Aschoff et al., 1983
Infradiano	>28 h	Ovoposición en <i>Folsomia candida</i>	Chiba et al., 1973
Circanual	1 año ± 2 meses	Germinación de <i>Phaseolous vulgaris</i>	Spruyt et al., 1988
Circalunar	29,53 días	Ciclo reproductivo de <i>Platynereis dumerilii</i>	Zantke et al., 2013
Circamareal	24,8 h	Ritmo de actividad de <i>Uca princeps</i>	Stillman y Barnwell, 2004

Tal y como expresa Madrid (2006), existen diferentes mecanismos medidores del paso del tiempo (relojes) en los seres vivos. Un ejemplo conocido de reloj biológico sería el reloj celular, implicado en el proceso de pérdida de capacidad de división de una célula, su envejecimiento y su muerte después de la división de un número limitado de veces. En este proceso intervienen unas estructuras, situadas en el extremo de los cromosomas, llamadas telómeros. Estos se acortan a medida que la célula se va dividiendo hasta llegar a una longitud crítica que desestabiliza el cromosoma, desencadenando, finalmente, un proceso de apoptosis.

Ahora bien, en Cronobiología, cuando se hace referencia a los relojes biológicos, se hace referencia a **los relojes generadores de ritmos**. Se pueden definir como el conjunto de estructuras capaces de generar ritmos sincronizados a determinadas variables ambientales. Cabe señalar la diferencia entre un *oscilador*, que sería una estructura capaz de generar cambios rítmicos en su funcionamiento, y un *marcapasos*, definido como oscilador, o conjunto de ellos, implicados en el funcionamiento de osciladores secundarios.

La mayoría de los estudios que se han realizado en Cronobiología tratan los ritmos circadianos. Por tanto, los relojes circadianos son los que más se han caracterizado (Menaker, 2002; Koukkari y Sothorn, 2006). Las propiedades de estos ritmos serán explicadas en el apartado 1.1.1.

En el ser humano, muchos aspectos de su fisiología y comportamiento varían siguiendo un ritmo circadiano. Por ejemplo, es conocido el hecho que varios factores endocrinos exhiben oscilaciones dependiendo de la hora del día (Gamble et al., 2014). Diversos aspectos del sistema cardiovascular, incluyendo la función endotelial, la formación de trombos, la presión arterial y la tasa cardíaca, son regulados por el reloj circadiano. Además, la aparición de determinadas enfermedades cardiovasculares muestra una ritmicidad circadiana (Crnko et al., 2019). El ritmo sueño-vigilia es, quizás, el ritmo circadiano más evidente y estudiado en el ser humano (y otros animales), por lo cual se desarrollará con más profundidad en el apartado 1.1.2.

Asimismo, una gran diversidad de manifestaciones de naturaleza circadiana puede observarse en distintos organismos. Por ejemplo: en la vocalización de cortejo nocturno en *Porichthys notatus* (Feng y Bass, 2016), en el comportamiento social y de búsqueda de alimento en *Apis mellifera* (Bloch, 2017), en el comportamiento natatorio de *Platynereis dumerilii* (Bucher, 2014), en la longitud ocular axial y grosor coroidal de *Gallus gallus* (Papastergiou et al., 1998), en la actividad locomotora voluntaria en roedores (Verwey et al. 2013), etc.

La naturaleza ubicua de los ritmos circadianos sugiere que confieren una ventaja adaptativa a los organismos que los poseen (Sheeba et al., 1999). Se puede definir el término “adaptación” como una variante fenotípica de un conjunto específico de variantes, en un ambiente determinado, que resulta en la máxima aptitud (*fitness*), entendiéndose este último término como la contribución media de un genotipo a las futuras generaciones, es decir, una medida de éxito reproductivo (Yerushalmi y Green, 2009). Se ha hipotetizado que los relojes circadianos confieren una ventaja adaptativa a los seres vivos (i) programando sus procesos comportamentales y fisiológicos con relación a las dificultades y oportunidades ambientales (ventaja extrínseca); (ii) adquiriendo un orden temporal en la fisiología interna (ventaja interna); y (iii) mediando las respuestas de los organismos a los cambios estacionales (Vaze y Sharma, 2013).

### 1.1.1. Características de los ritmos circadianos

Las propiedades fundamentales de un reloj circadiano y, por tanto, de los ritmos circadianos son (Cambras, 2006; Valentinuzzi y Oda, 2017):

- 1) Carácter endógeno: Los ritmos circadianos presentan un carácter endógeno, es decir, ocurren independientemente de las condiciones ambientales. De esta manera, para determinar si un ritmo es endógeno, se puede aislar un organismo de las variaciones cíclicas ambientales manteniéndolo en un ambiente constante. Cuando el animal se mantiene en esas condiciones, decimos que se encuentra en “curso libre”. Si en estas condiciones constantes el ritmo observado persistiera, se confirmaría que se trata de un ritmo endógeno.

Suponiendo que un organismo estuviera bajo unas condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, al poder detectar los cambios en los niveles de iluminación, este va a presentar un ritmo de 24 horas. Si al cabo de un tiempo se apagan las luces permanentemente, es decir comienza un “curso libre”, el patrón rítmico empezará a desfasarse respecto a las 24 horas, deduciéndose que el ritmo del animal no es de 24

horas exactas. En un curso libre, la fase de actividad se denomina *alfa* ( $\alpha$ ), la fase de reposo *rho* ( $\rho$ ), y su período *tau* ( $\tau$ ).

- 2) Encarrilamiento a ciclos exógenos: A pesar de que el reloj circadiano se manifiesta en curso libre, hay que destacar que su función no es marcar el ritmo en condiciones invariables, sino permitir la adaptación con los ciclos del entorno. El procedimiento mediante el cual el período en curso libre adquiere el mismo valor que el ciclo externo y su misma fase (permaneciendo, entonces, sincronizados) se denomina encarrilamiento (del inglés *entrainment*). Entonces, el ciclo externo ejerce un control sobre la fase del ritmo. Los agentes encarriladores se dominan *Zeitgeber* cuya traducción literal del alemán es “dador de tiempo”. El principal agente encarrilador en la naturaleza son los ciclos luz-oscuridad y, por ello, la mayoría de los estudios sobre encarrilamiento se han realizado con este *Zeitgeber*.
- 3) Compensación de la temperatura: Los procesos bioquímicos y fisiológicos son sensibles a los cambios de temperatura. Estos se aceleran a medida que aumenta la temperatura y se entrecen a medida que disminuye. Para calcular los efectos de las variaciones en la velocidad de reacción de un proceso bioquímico se utiliza el coeficiente de temperatura  $Q_{10}$ , este es,

$$Q_{10} = \frac{R_2^{10/(T_2 - T_1)}}{R_1} \quad (1)$$

donde R es la ratio de la variable que se está midiendo y T es la temperatura. El  $Q_{10}$  corresponde al cociente entre dos valores medidos con una diferencia de 10°C. De este modo, si un valor se duplica en un intervalo de 10°C,  $Q_{10} = 2$ . La mayoría de las reacciones bioquímicas tienen un  $Q_{10}$  entre 2 y 3, pero los procesos circadianos presentan un  $Q_{10}$  de 0,8 a 1,3, hecho que pone de manifiesto la existencia de un mecanismo de compensación de la temperatura, todavía poco comprendido.

### 1.1.2. Ritmo sueño-vigilia

La alternancia de sueño-vigilia cada 24 h es el ritmo circadiano más evidente y al que prestamos mayor atención. Pasamos aproximadamente un tercio de nuestra vida durmiendo. Al igual que beber o comer, dormir es esencial para la vida. Aun así, a diferencia del beber o del comer, la función exacta del sueño sigue siendo un misterio (Miyazaki et al., 2017). El hecho de que se considere que la función del sueño sirve una necesidad biológica deriva de tres líneas de evidencia (Rattenborg et al., 2007; Cirelli y Tononi, 2008; Siegel, 2009): (i) es un fenómeno evolutivo universalmente conservado, (ii) la restricción crónica del sueño se asocia a menudo a la muerte, y (iii) no se han encontrado animales sin sueño.

A pesar de la ubicuidad de este fenómeno en el reino animal, cada especie muestra diferentes características de sueño, hecho que dificulta la elaboración de una definición universal de este proceso. Por una parte, el sueño puede definirse desde un punto de vista comportamental y, por otra, desde un punto de vista electrofisiológico (Rechtschaffen y Kales, 1968; Rial et al., 2010; Miyazaki et al., 2017). Los rasgos comportamentales asociados al sueño son: (i) reposo motor, (ii) umbrales sensoriales elevados, (iii) fácil reversibilidad, (iv) posición estereotipada, (v) recurrencia circadiana, (vi) lugares dormitorio específicos y (vii) estado regulado en qué se puede reconocer “privación” o “saciedad” de sueño.

Se ha propuesto que, para considerar que un organismo presenta un sueño comportamental, debe presentar al menos cuatro de los siete rasgos mencionados con anterioridad y, si alguna especie tuviera un número menor de estos rasgos, debemos considerar que carece de un sueño verdadero, presentando meramente un estado de reposo (Nicolau et al., 2000). Debido a la arbitrariedad de esta distinción, Rial et al. (2007) proponen que el concepto de sueño debería restringirse a mamíferos y aves, ya que tienen estadios y signos fisiológicos bien

definidos con una regulación circadiana y homeostática, mientras que otros animales poseerían un simple estado de reposo.

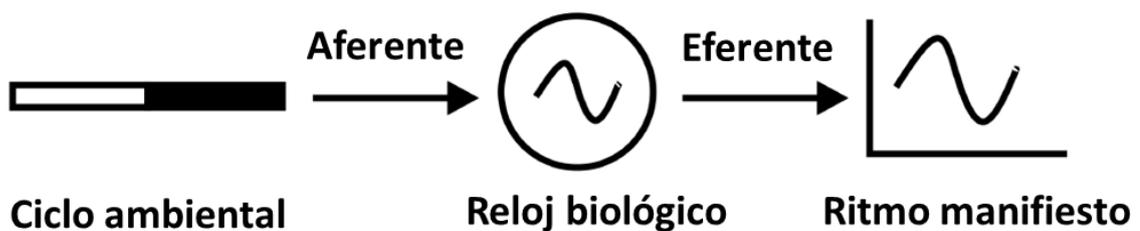
Las características electrofisiológicas del sueño en animales se determinan por los niveles de actividad muscular detectados por electromiografía (EMG), por los movimientos oculares detectados por electrooculografía (EOG) y por las características de las señales eléctricas cerebrales detectadas por electroencefalografía (EEG). El sueño en mamíferos y aves puede dividirse en dos tipos principales: el sueño no REM (NREM) y el sueño REM (del inglés *rapid eye movement*, “movimiento ocular rápido”). El sueño NREM, por su parte, se subdivide en cuatro fases: F1, F2, F3 y F4 (asociados con una creciente profundidad del sueño) y se caracteriza desde el punto de vista electrofisiológico por la presencia de oscilaciones lentas, husos de sueño, complejos K y ondas delta.

Mientras que se conoce desde hace mucho que las aves y los mamíferos poseen sueño REM y NREM, se creía que existía solamente un hipotético predecesor del sueño NREM en reptiles. Ello condujo a la hipótesis de que los distintos estadios del sueño evolucionaron convergentemente en aves y mamíferos, posiblemente debido a factores ecológicos que, a su vez, condujeron a su endotermia (Joiner, 2016). Sin embargo, recientes evidencias de registros de EEG muestran que lagartos ectotérmicos probablemente también poseen sueño REM y NREM (Shein-Idelson et al., 2016). La existencia de este estado de sueño REM en lagartos sugiere que no solo los animales homeotérmicos muestran dos estados de sueño, lo cual complica la elucidación del origen evolutivo de los dos estados de sueño (Libourel et al., 2018).

## 1.2. Organización del sistema circadiano

El sistema circadiano está constituido por cuatro componentes principales (Fig. 1) (Golombek y Yannieli, 2006; Valentuzzi y Oda, 2017):

- i. Un sincronizador ambiental (*zeitgeber*).
- ii. Un reloj generador de ritmos circadianos.
- iii. Vías aferentes, o *inputs* neurales, hacia otras partes del cerebro.
- iv. Vías eferentes del reloj hasta hacia otros tejidos, los cuales acoplan su ritmicidad interna con la del reloj.

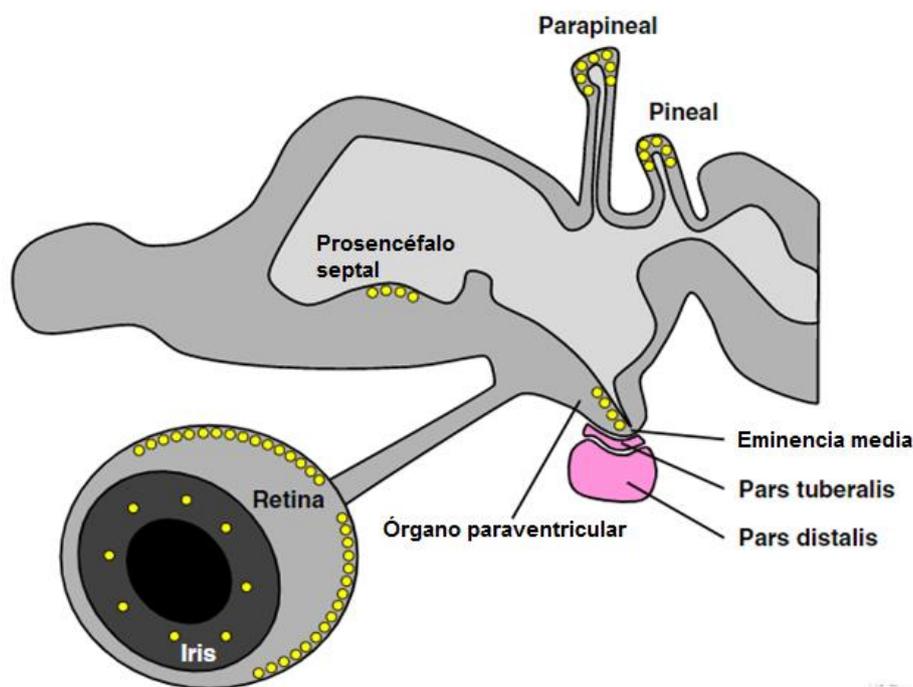


**Figura 1:** Diagrama de los principales componentes del sistema circadiano. Adaptado de Valentuzzi y Oda, 2017.

La alternancia luz-oscuridad es el principal componente de los ciclos ambientales con periodicidad circadiana y, por tanto, el principal *zeitgeber*. De este modo, uno de los principales componentes del sistema circadiano será su conexión anatómico-fisiológica con la percepción de la luz (Golombek y Yannieli, 2006). Por ello, es indispensable que los distintos organismos posean órganos específicos destinados a la fotorecepción.

Como exponen Peirson et al. (2009), los vertebrados poseen un amplio espectro de estructuras de fotorecepción. Entre estas, cabe destacar los ojos laterales, en concreto, la retina, el principal sitio de

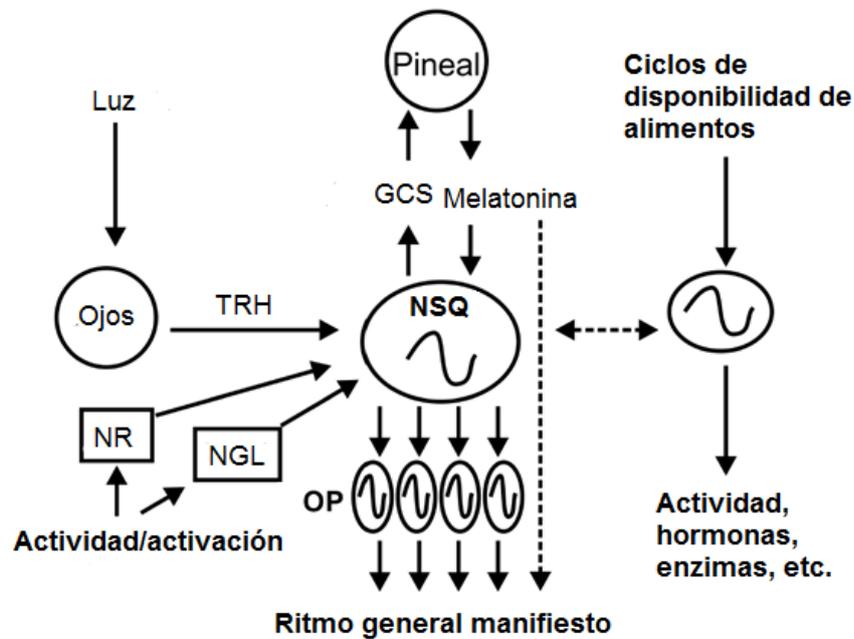
fotorrecepción en vertebrados y constituyente del sistema visual. Se conoce que, en mamíferos, el sistema visual está compuesto por vías formadoras de imágenes y vías no-formadoras de imágenes. La fotorrecepción para las vías formadoras de imágenes se da en los conos y bastones de la retina, mientras que la fotorrecepción para las vías no-formadoras de imágenes se da en las células ganglionares intrínsecamente fotosensitivas (ipGRCs), que contienen el pigmento melanopsina. La estructura fotorreceptora más conocida, a parte de la retina, es la glándula pineal (epífisis). Se usa el término “complejo pineal” para referirse a la glándula pineal propiamente dicha y a la glándula parapineal (ambas intracraneales), así como a los “tercer” ojos extracraneales encontrados en algunos lagartos (Lacertidae) y ranas (Anura). El órgano parapineal se encuentra tan solo en algunos peces, y su función es poco conocida. Los “tercer” ojos extracraneales se pueden subdividir en órganos frontales, en anfibios anuros, y en los “ojos parietales”, encontrados en lagartos. Estos últimos poseen una destacable similitud estructural con los ojos laterales. En mamíferos, la glándula pineal carece de fotosensibilidad, es exclusivamente secretoria. También se pueden encontrar otros lugares de fotorrecepción en estructuras cerebrales profundas o el iris (Fig. 2) e incluso en tejidos periféricos.



**Figura 2:** Fotorreceptores no visuales en los vertebrados. La glándula parapineal se encuentra solo en algunos peces. La glándula pineal es fotosensitiva en todos los vertebrados no mamíferos. El iris también es intrínsecamente fotosensitivo en estos grupos también y quizás en algunos mamíferos. Las ubicaciones putativas de los fotorreceptores no visuales (mostrados en amarillo) en estructuras cerebrales profundas varían entre los vertebrados no mamíferos. Los únicos fotorreceptores no visuales en los mamíferos son las células ganglionares intrínsecamente fotosensitivas de la retina. Modificada de Menaker, 2014.

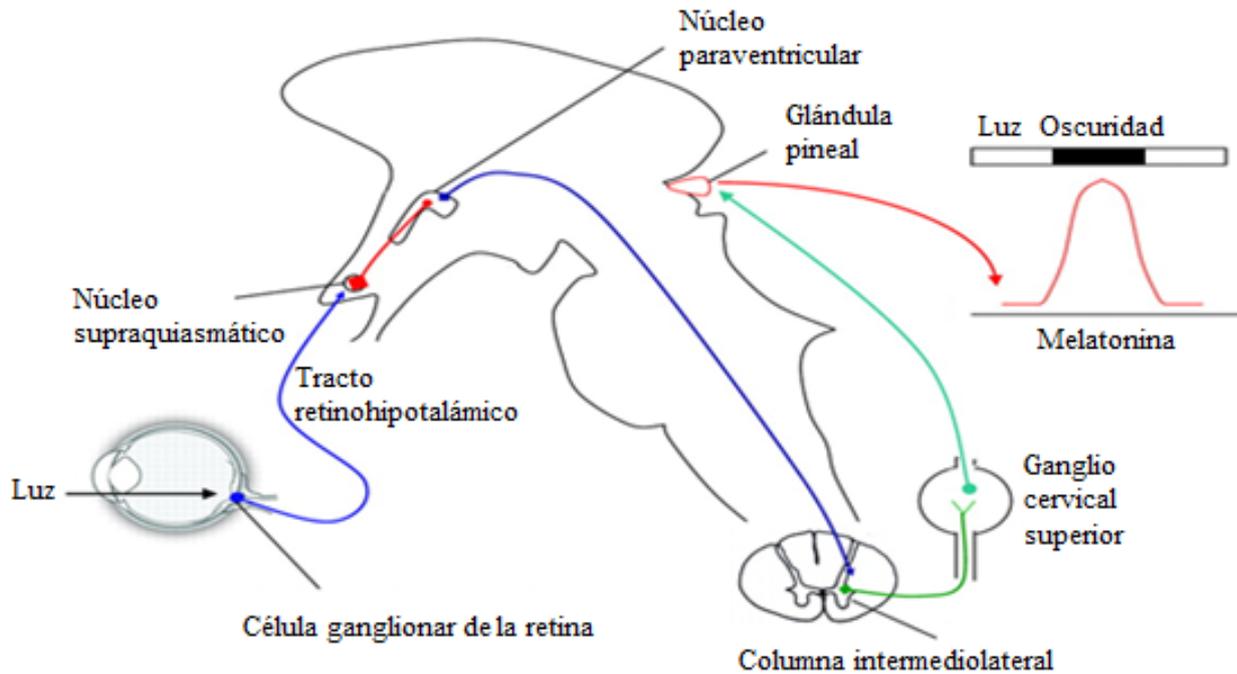
En mamíferos, el marcapasos principal está ubicado en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ), situados en el hipotálamo ventral anterior (Golombek y Yannieli, 2006). En esta estructura anatómica, se generan señales intrínsecas oscilatorias con un período cercano a las 24 horas. Se ha demostrado en experimentos en ratas que la ablación de los NSQ conlleva a la pérdida de numerosas funciones fisiológicas y conductuales, de tal manera que dichas funciones se presentan en un patrón al azar (esto se conoce como “arritmicidad”) (Stephan y Zucker, 1972). Además, el trasplante de los NSQ en animales cuyos propios núcleos han sido extirpados da como resultado la restauración del ritmo manifiesto en el huésped arrítmico (Ralph y Lehman, 1991).

El sistema circadiano también está constituido por osciladores secundarios, controlados por los NSQ, y por vías de salida de los NSQ hacia estos sistemas efectores. Otro componente del sistema circadiano son las vías de entrada de información fótica, como el tracto retinohipotalámico, que lleva información lumínica directamente al reloj y permiten su encarrilamiento al ciclo luz-oscuridad ambiental. Finalmente, cabe destacar el papel de las vías de entrada no fóticas (Fig. 3), también capaces de sincronizar los NSQ (Valentuzzi y Oda, 2017).



**Figura 3:** Representación esquemática de algunos de los componentes del sistema circadiano y sus interacciones. GCS: ganglio cervical superior; NR: núcleos de Rafe; NGL: núcleos geniculados laterales; NSQ: núcleos supraquiasmáticos; TRH: tracto retinohipotalámico. OP: osciladores periféricos. Modificada de Valentuzzi y Oda, 2017.

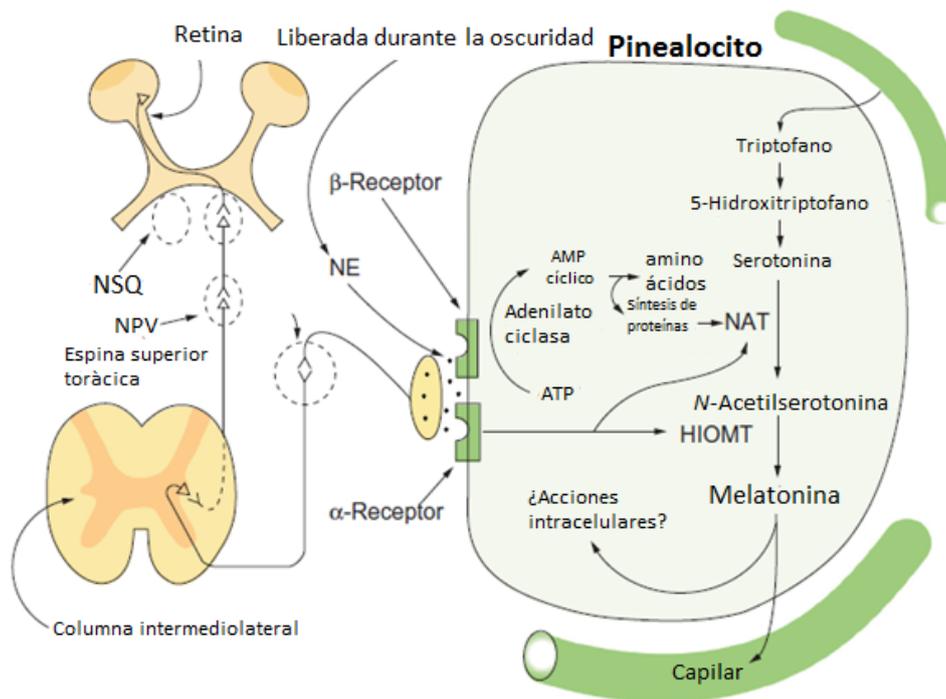
Un nexo importante que implica la regulación del sistema nervioso central y periférico por parte de los NSQ es el control de la glándula pineal y su secreción circadiana de melatonina (Valentuzzi y Oda, 2017). La secreción de melatonina se encarrila al período de oscuridad. Tal como exponen Claustart et al. (2005), la información fótica se transmite al marcapasos central a través del tracto retinohipotalámico, formado por axones de las células ganglionares intrínsecamente fotosensitivas que contienen melanopsina de la retina. De día, el *output* de este tracto inhibe la síntesis de melatonina. La vía neural desde el núcleo supraquiasmático hasta la glándula pineal pasa primero por la parte superior de la medula espinal (Fig. 4), donde se hace sinapsis con los cuerpos neuronales de los ganglios superiores cervicales, y luego estos a la glándula pineal (Benarroch, 2008).



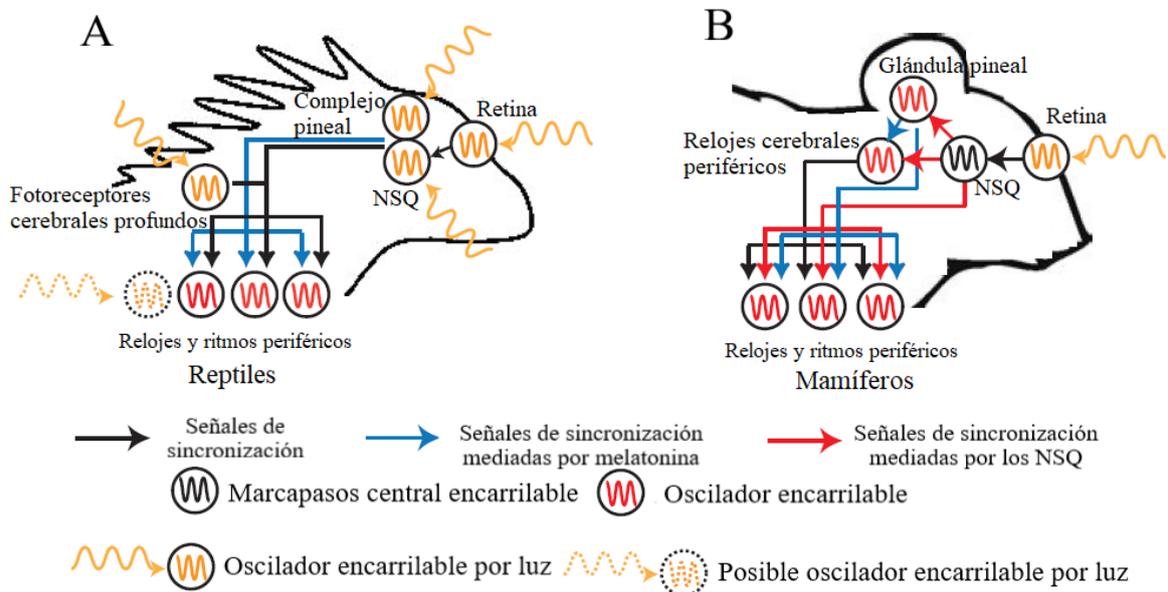
**Figura 4:** Regulación de la secreción de melatonina. La regulación circadiana de la secreción de melatonina depende de una vía indirecta que se origina en las células ganglionares fotosensitivas de la retina y llega, a través del tracto retinohipotalámico, al núcleo supraquiasmático, que es el marcapasos circadiano central. El núcleo supraquiasmático, a través de una proyección inhibitoria del núcleo paraventricular del hipotálamo, controla la salida simpática a la glándula pineal que es responsable del pico de secreción de melatonina durante la oscuridad. Modificada de Benarroch, 2008.

La melatonina es sintetizada en los pinealocitos de la glándula pineal a partir de la serotonina a través dos etapas enzimáticas (Fig. 5). Primero, la serotonina *N*-acetiltransferasa acetila la serotonina para producir *N*-acetilserotonina. El segundo paso implica la transferencia de un grupo metilo (*S*)-adenosilmetionina al grupo 5-hidroxi de *N*-acetilserotonina a través de la enzima hidroxindol-*O*-metiltransferasa (HIOMT) (Dubocovich et al., 2010). La abundancia de receptores de melatonina en distintas áreas cerebrales (incluyendo los NSQ) y tejidos periféricos es un indicador de que la melatonina actúa como sincronizador endógeno de multitud de ritmos circadianos, incluyendo los ciclos de sueño-vigilia.

El papel de los NSQ como marcapasos central en el control de los ritmos circadianos en mamíferos es una sofisticación respecto a los mecanismos observados en vertebrados inferiores (Patton y Hastings, 2018), que, dependiendo de la especie, pueden controlar ritmos conductuales circadianos mediante la secreción nocturna de melatonina directamente en las estructuras fotorreceptoras. De esta manera, mientras que en los mamíferos el sistema entero es coordinado a través de los NSQ, encarrilados fóticamente a través de la retina (Fig. 6A), en aves y reptiles el marcapasos central del sistema circadiano se basa en la acción conjunta de los NSQ y el complejo pineal (Fig. 6B).

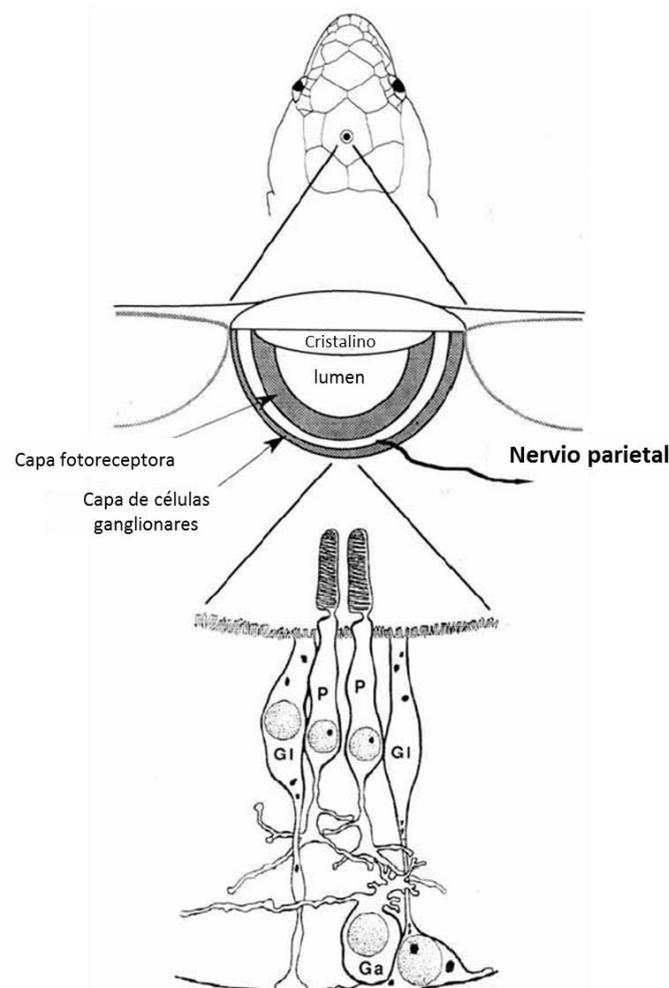


**Figura 5:** Biosíntesis de melatonina en los pinealocitos. HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferasa; NE: norepinefrina, NAT: *N*-acetiltransferasa; NPV: núcleo paraventricular; NSQ: núcleos supraquiasmáticos. Modificado de Litwack, 2018.



**Figura 6:** Comparación de los sistemas circadianos en mamíferos y reptiles. (A) En los reptiles, el sistema está basado en los NSQ y el complejo pineal de manera conjunta, y la melatonina es un mediador crítico del control del reloj circadiano. (B) En mamíferos, el sistema circadiano está basado únicamente en los NSQ, con un acceso restringido para el encarrilamiento fótico a través de la retina. Adaptada de Patton y Hastings, 2018.

Como se ha mencionado con antelación, los reptiles de la familia de los lacértidos (y otros escamosos) poseen una estructura fotosensitiva llamada ojo parietal (Gundy y Wurst, 1976). El ojo parietal presenta similitudes a los ojos laterales en cuanto a que están provistos de una cornea, un cristalino y una retina. No obstante, la retina del ojo parietal solamente posee fotorreceptores, células ganglionares y células gliales (a diferencia de los ojos laterales, que tienen células bipolares, horizontales, amacrinas, y un epitelio pigmentario retinal), además de tener una orientación contraria, ya que los fotorreceptores están orientados hacia la parte frontal del ojo, siendo las primeras células de la retina en recibir la luz (Luo et al. 2009) (Fig. 7). Cabe destacar también que cada fotorreceptor presenta dos pigmentos: la pinopsina (sensible a luz azul) y la parietopsina (sensible a luz verde). Cada uno está implicado en una vía de fototransducción diferente, antagonistas entre sí: la vía de la pinopsina estaría implicada en la hiperpolarización de la membrana mientras que la parietopsina estaría implicada en la despolarización (Solessio y Engbretson, 1993). El ojo parietal está conectado mediante, el nervio parietal, al sistema nervioso central y a la glándula pineal (Fig. 7), cuyo producto principal, igual que en mamíferos, es la melatonina (Embregtson y Len, 1975).



**Figura 7:** El ojo parietal de los lagartos se localiza en un pequeño foramen entre los huesos parietales. El cristalino se sitúa inmediatamente por debajo de un epitelio equivalente a una cornea. Entre el cristalino y la retina se encuentra el lumen, en el cual proyectan los segmentos externos de los fotorreceptores. La retina tiene una única capa plexiforme donde los procesos de los fotorreceptores (P) y las células ganglionares (Ga) se encuentran. Las células gliales (Gl) abarcan toda la retina. Adaptada de Solessio y Engbretson (1993).

En reptiles el complejo pineal está implicado en multitud de procesos fisiológicos y conductuales (Tosini, 1997): en la termorregulación, en los ritmos de actividad y organización circadiana (gracias a su función fotorreceptora y de marcapasos, como ya se ha comentado), en la fisiología reproductora, y en otros procesos como la orientación o el gasto energético.

En relación con el papel del ojo parietal en la organización circadiana de los ritmos de actividad-reposo, nos hemos preguntado: (i) ¿qué efecto provocaría la oclusión del ojo parietal en lagartos de la especie *Gallotia galloti*?; y (ii) ¿tendría el mismo efecto desincronizador del ritmo de actividad-reposo que una pinealectomía? De estas preguntas surgió el propósito de nuestro trabajo.

## 2. Objetivos e hipótesis

---

Molina-Borja (1996) demostró que la pinealectomía (i.e. la extirpación de la glándula pineal) induce arritmicidad en ejemplares de la especie *Gallotia galloti*, indicando que la glándula pineal actúa como marcapasos central. Como se ha mencionado con anterioridad, el ojo parietal forma parte del complejo pineal (junto a la glándula pineal), siendo ambas estructuras fotosensitivas y estando conectadas por el nervio parietal. Proponemos, entonces, que el ojo parietal es una estructura necesaria para el funcionamiento de la glándula pineal como marcapasos central y, por tanto, sostenemos la hipótesis de que la oclusión del ojo parietal, que bloquearía la llegada de la estimulación lumínica ambiental al complejo pineal, provocaría un desajuste pronunciado en el ritmo actividad-reposo y eliminaría la capacidad de encarrilamiento en lagartos de la especie *Gallotia galloti*. En caso contrario, habrá que considerar que hay otra u otras vías que sincronizan el ritmo actividad-inactividad en esta especie. Por consiguiente, los objetivos específicos del presente trabajo son:

- Estudiar los efectos de diferentes ritmos de luz-oscuridad sobre la actividad locomotora del lacértido *Gallotia galloti*.
- Determinar el ritmo endógeno y parámetros cronobiológicos de *Gallotia galloti* mediante el uso de herramientas de análisis cronobiológico.
- Elucidar la importancia del ojo parietal en la regulación del ciclo actividad-reposo, en dicha especie, tras su oclusión.
- Comparar la equivalencia de los efectos de la oclusión con otros experimentos clásicos (e.g. pinealectomía).

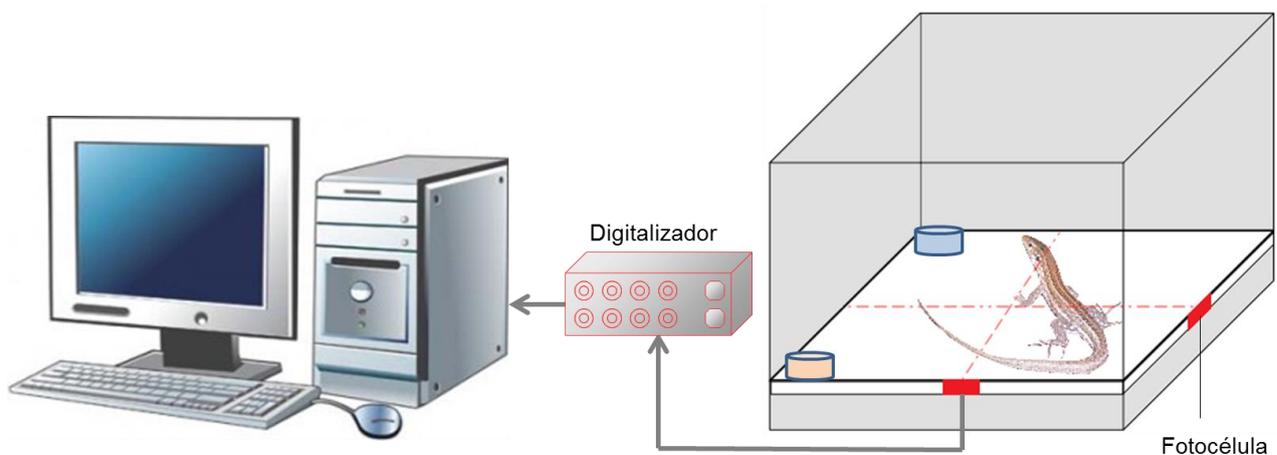
## 3. Metodología experimental

### 3.1. Animales

Para este estudio, hemos utilizado 11 individuos de la especie *Gallotia galloti* (orden Squamata, familia Lacertidae), endémica de las islas de Tenerife y La Palma. Su captura fue autorizada por el Gobierno Autónomo Canario y los ejemplares se mantuvieron en el estabulario de la UIB para su cuidado. Posteriormente, introdujimos cada lagarto en una jaula de 23 cm x 21 cm, provisto de gravilla, cubierta con una malla sujeta por gomas elásticas, y con dos placas de Petri para depositar comida y agua. Estos animales se mantuvieron en una cámara a temperatura constante (27 °C) y se alimentaron con compota de fruta cada 10 días.

### 3.2. Registro de la actividad locomotora

Para el registro de la actividad locomotora, colocamos cada jaula en un marco provisto de dos sensores infrarrojos fotoeléctricos. Los sensores permiten detectar, mediante haces de luz, los movimientos de los animales. Cada interrupción, ocasionada por los individuos al moverse, en el haz de luz se registra mediante un microcomputador (USB-DIO24/37, Measurement Computing Corporation), que digitaliza la señal y la envía a un ordenador para su posterior análisis (Fig. 8). El programa utilizado para el control del microcomputador es el DAS-24\_V29.



**Figura 8:** Montaje para el registro de la actividad locomotora de los animales. Cortesía de Mourad Akaârîr.

El registro de la actividad se dio en dos etapas, cada una dividida en tres condiciones experimentales:

1. Registro de la actividad locomotora de los lagartos con el ojo parietal sin cubrir:
  - a) 9 días en condiciones de 12 horas de luz (desde las 8h a las 20h) y 12 horas de oscuridad (desde las 20h hasta las 8h) (LO: 12/12)
  - b) 9 días en condiciones de luz continua (24 horas de luz) (LL:12/12)
  - c) 9 días en condiciones de 12 horas de luz (desde las 8h a las 20h) y 12 horas de oscuridad (desde las 20h hasta las 8h) (LO: 12/12)

## 2. Registro de la actividad locomotora de los lagartos con el ojo parietal cubierto:

- a) 9 días en condiciones de 12 horas de luz (desde las 8h a las 20h) y 12 horas de oscuridad (desde las 20h hasta las 8h) (LO: 12/12)
- b) 9 días en condiciones de luz continua (24 horas de luz) (LL:12/12).
- c) 9 días en condiciones de 12 horas de luz (desde las 8h a las 20h) y 12 horas de oscuridad (desde las 20h hasta las 8h) (LO: 12/12).

Entre cada condición, se dejó un día sin registrar (en las condiciones del nuevo registro a empezar), en el que se cambió el alimento y agua de los animales. Entre la etapa 1 y 2 se dejaron 9 días sin registrar, en condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, para asegurarnos que los animales estuvieran bien encarrilados a los ciclos de luz-oscuridad.

### 3.3. Oclusión del ojo parietal

Para tapar el ojo parietal, primeramente, eliminamos el exceso de piel muerta del ojo parietal y zonas adyacentes mediante la ayuda de un bisturí. Con la ayuda de unas pinzas, colocamos dos trozos superpuestos de tela opaca impregnadas en cianocrilato sobre el ojo parietal, asegurándonos que este último quede totalmente cubierto (Fig. 9).



**Figura 9:** Fotografía de un lagarto de la especie *Gallotia galloti* cuyo ojo parietal ha sido cubierto con dos trozos de tela opaca.

### 3.4. Análisis de datos

#### Análisis visual: actograma

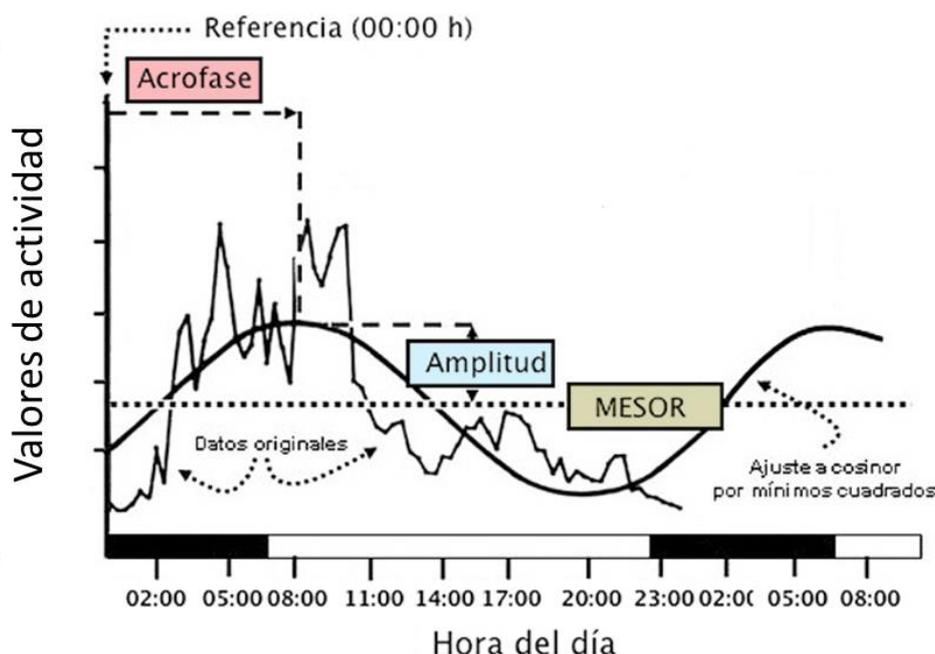
El actograma consiste en ordenamiento consecutivo de gráficas de ocurrencia de eventos (Vega, 1993). El ordenamiento vertical de los datos nos permite observar el encarrilamiento a los ciclos de luz-oscuridad ambientales y el desfase de la actividad en condiciones constantes. Los actogramas fueron realizados mediante el programa OriginPro.

#### Ajuste a una función coseoidal: método del cosinor

La técnica del *Cosinor* consiste en el ajuste estadístico de una serie temporal a una función cosenoidal mediante un procedimiento conocido como regresión por mínimos cuadrados (Díez, 2006). Este procedimiento nos permite cuantificar las características del ritmo y realizar su representación gráfica (Fig. 10). La expresión matemática de la expresión empleada es la siguiente:

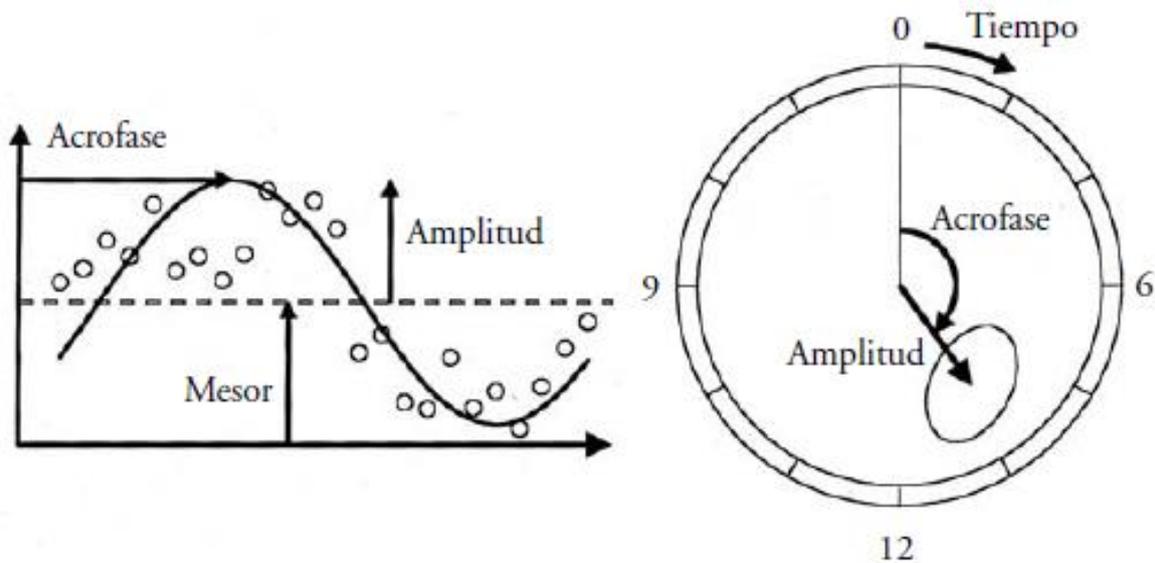
$$Y(t) = M + A \cos \left( \frac{2\pi}{T} t - \Phi \right) \quad (2)$$

Los parámetros que nos permite hallar son la amplitud (A), la acrofase ( $\Phi$ ) y el mesor (*midline estimating statistic of rhythm*) (M). La amplitud hace referencia a la diferencia entre la distancia del mesor y el máximo de la función ajustada. La acrofase corresponde al valor temporal en qué se da el valor máximo de la función. El mesor es el valor medio del ritmo ajustado a la función, por lo que no tiene que coincidir con la media aritmética de los datos. T corresponde al período, 24 h en el caso de los ritmos circadianos. La obtención de dichos parámetros se ha realizado mediante el programa Circadianware (versión 3.0).



**Figura 10:** Diagrama en el que se indica como una serie de valores de actividad a distintas horas del día (“datos originales”) se ajustan a una función cosenoidal (“ajuste cosinor por mínimos cuadrados”). Sobre la función resultante del ajuste se indican los parámetros que definen un ritmo biológico: MESOR, amplitud y acrofase. Adaptada de <https://ocw.unican.es/mod/page/view.php?id=713>.

Los resultados obtenidos de la aplicación de dicho método se representan en un gráfico característico que consiste en la representación polar del vector definido por  $A$  y  $\Phi$ . Para ello, se representa un círculo que corresponde a un reloj imaginario de 24 horas, en interior de la cual se representa un vector cuya longitud es proporcional a la amplitud  $A$  del ritmo, y cuyo extremo apunta a la  $\Phi$ . Los intervalos de confianza del 95% de estos dos parámetros se representan de manera conjunta en forma de elipse en torno al extremo del vector (Fig. 11).

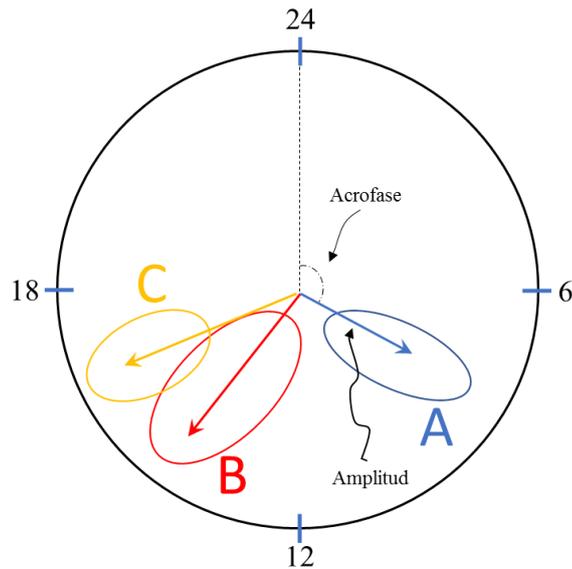


**Figura 11:** Representación gráfica de los parámetros característicos de un ritmo, utilizando el ajuste de la serie temporal a una función sinusoidal (Cosinor). A la izquierda están representados los puntos correspondientes a los valores de la serie junto con la función ajustada, y a la derecha la representación polar de la acrofase y la amplitud estimadas mediante el método del Cosinor junto con la elipse de confianza para el 95%. Tomado de Golombek, 2007.

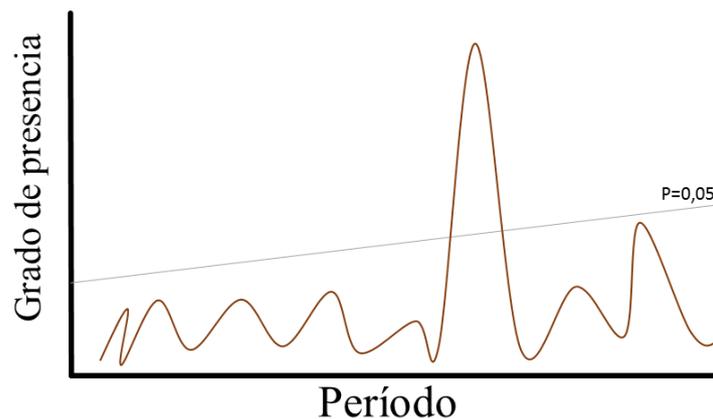
Esta representación permite comparar dos Cosinors diferentes. Para ello, se representan los Cosinors a comparar con sus elipses de confianza en el mismo círculo (Díez, 2006). Si dos elipses se intersectan, indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los Cosinor, en caso contrario, sí existen diferencias (Fig.12). La representación gráfica del método Cosinor se ha realizado mediante el programa Ritme v.6-c, desarrollado por el Grup de Cronobiologia de la Universitat de Barcelona.

### Determinación del período: periodograma

Para estimar el período del ritmo endógeno ( $\tau$ ), se recurrió a la técnica del periodograma, una técnica matemática que permite estimar el periodo de los componentes responsables de la periodicidad de un fenómeno (Vega, 1993). La representación de esta técnica se trata de una gráfica en que en el eje de las abscisas se representan valores de los períodos, y en el eje de ordenadas se representan los valores de una variable que indica el “grado de presencia” de cada periodo, la naturaleza de la cual varía dependiendo del tipo de periodograma utilizado (Fig. 13). La presencia de picos en la gráfica permite conocer los periodos de los ritmos presentes en la serie. La representación del periodograma se completa incluyendo una línea que indica el nivel de significación ( $p=0,05$ ), por lo que tan se considerarán significativos los picos que superen dicha línea (Noguera, 2006).



**Figura 12:** Representación gráfica del Cosinor con su elipse de confianza del 95%. Esta representación permite verificar visualmente las diferencias entre Cosinor. En este caso, no habría diferencias significativas entre los Cosinor B y C, ya que sus elipses se intersectan, mientras que el Cosinor A es significativamente diferente a los Cosinor B y C.



**Figura 13:** Representación gráfica de un periodograma. Solo aquellos picos que superan la línea diagonal se consideran estadísticamente significativos.

Para este estudio, se ha utilizado el método conocido como periodograma de Skolove-Bushell (Skolove y Bushell, 1978). El método consiste en la elaboración de una matriz de datos en la que cada fila contenga los datos correspondientes a un periodo. Esta disposición permite calcular las medias de cada columna y cuantificar la variabilidad entre dichas medidas. La medida de esta variabilidad se denomina  $Q_p$ , la cual es la variable que se emplea para representar el periodograma. Su fórmula se indica a continuación:

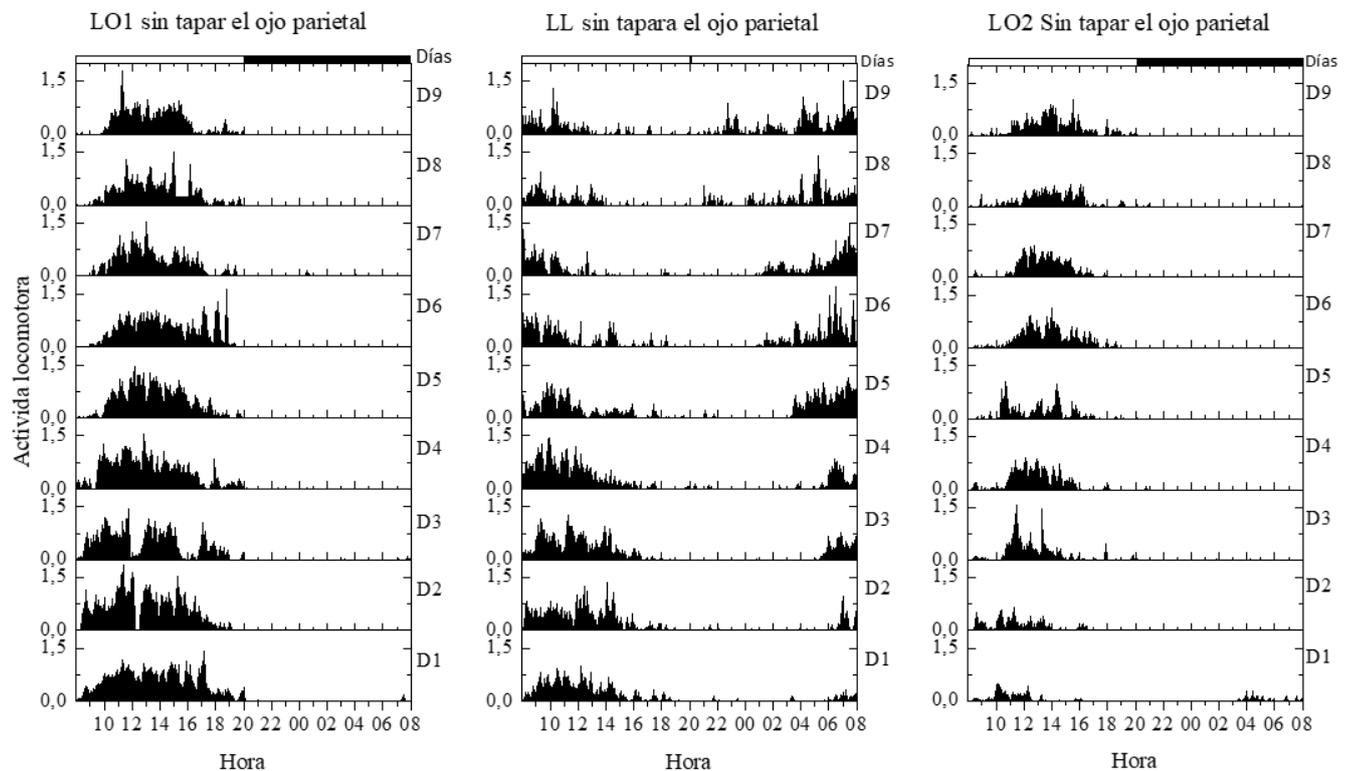
$$Q_p = \frac{NK \sum_{h=1}^p (\bar{X}_h - \bar{X})^2}{NK \sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2} \quad (3)$$

donde N es el número de datos, P el número de columnas, K el número de filas, X la media global y  $\bar{X}_h$  la media de la columna h. Para obtener  $\tau$  se ha empleado el programa Circadianware (versión 3.0).

## 4. Resultados

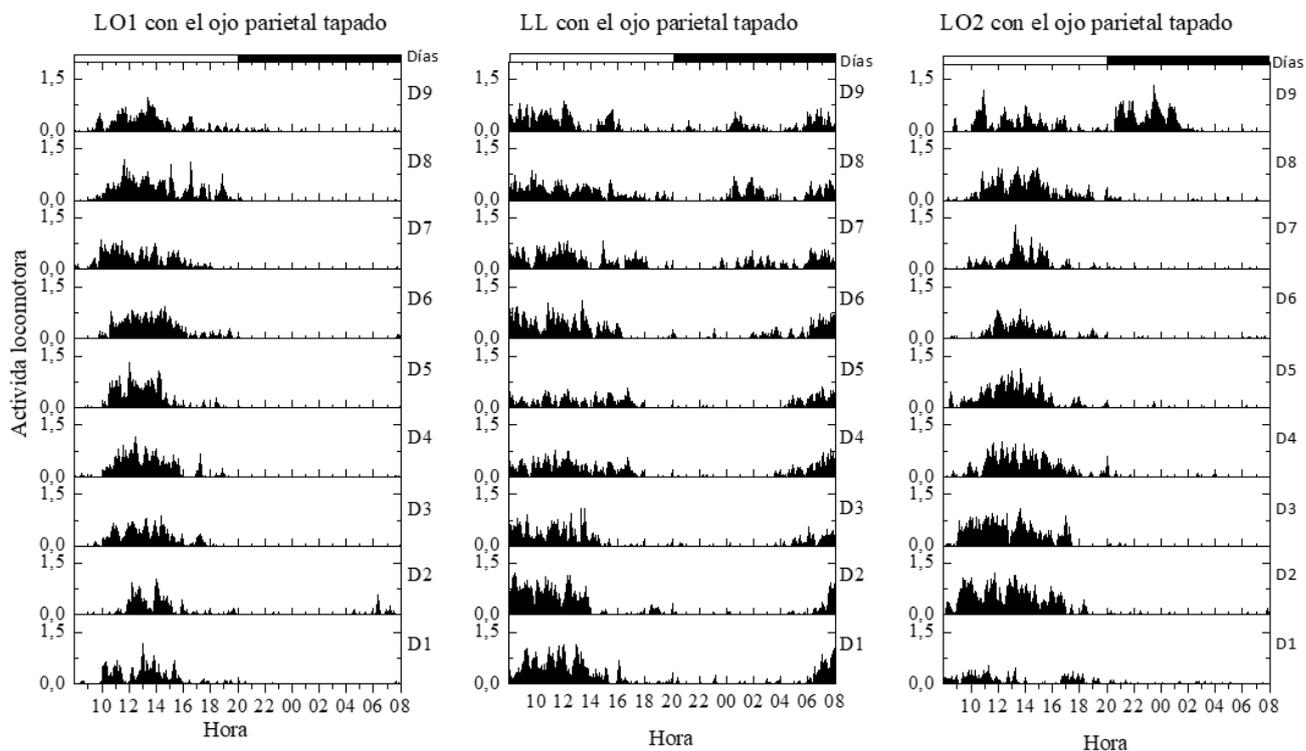
### 4.1 Actividad locomotora en curso libre y encarrilamiento a ciclos de luz oscuridad ambiental

Los resultados muestran que los animales con el ojo parietal destapado están encarrilados a ciclos de 24 horas de luz-oscuridad ambientales. Cuando están en curso libre (24 horas de luz constante) se puede observar un adelanto progresivo del momento de inicio de la actividad locomotora (retraso de fase). Cuando se retornan a las condiciones de luz-oscuridad, los animales se vuelven a encarrilar al ciclo (Fig. 14).



**Figura 14:** Actogramas que muestran la actividad locomotora de *Gallotia galloti* (con el ojo parietal intacto) en diferentes condiciones de luz-oscuridad. LO1: de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. LL: 24 horas de luz constante. LO2: se retoman las 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad iniciales. Las barras negras horizontales representan el periodo de oscuridad y las barras blancas el periodo de luz. Estos actogramas representan la actividad promedio de todos los animales. Los valores de actividad locomotora se obtienen calculando la media de los movimientos captados por el sensor cada 5 minutos. Los actogramas se han realizado mediante el programa OriginPro.

Al tapar el ojo parietal, los animales siguen estando encarrilados a los ciclos de luz oscuridad ambiental. Del mismo modo que en la etapa experimental anterior, cuando los animales entran en curso libre, experimentan un retaso de fase de la actividad locomotora y cuando se regresa a las condiciones de luz-oscuridad se vuelve a producir un encarrilamiento (Fig. 15).

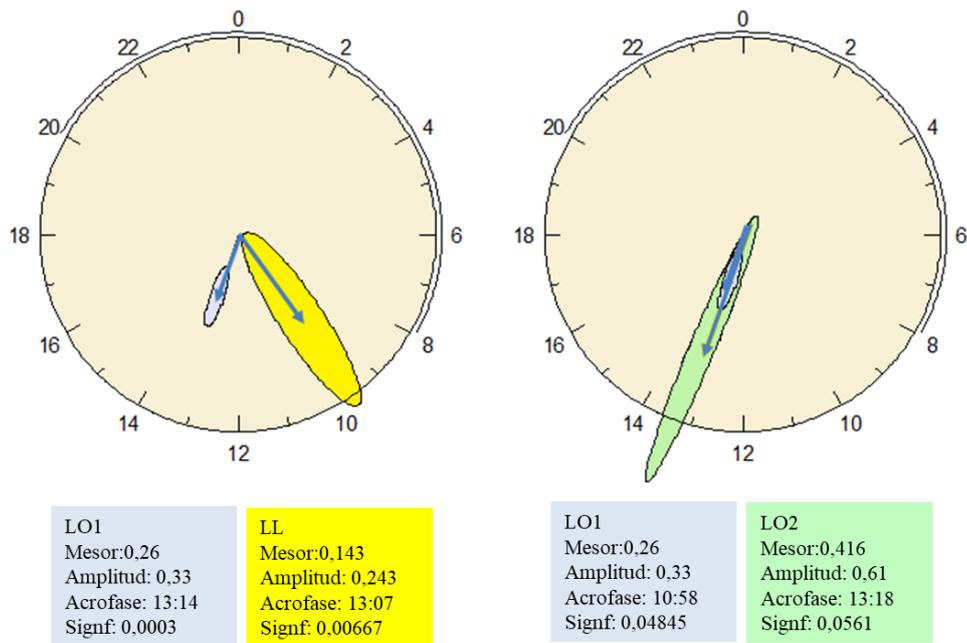


**Figura 15:** Actogramas que muestran la actividad locomotora de *Gallotia galloti* tras la oclusión del ojo parietal en diferentes condiciones de luz-oscuridad. LO1: de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. LL: 24 horas de luz constante. LO2: se retoman las 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad iniciales. Las barras negras horizontales representan el periodo de oscuridad y las barras blancas el periodo de luz. Estos actogramas representan la actividad media de todos los animales. Los valores de actividad locomotora se obtienen calculando la media de los movimientos captados por el sensor cada 5 minutos. Los actogramas se han realizado mediante el programa OriginPro.

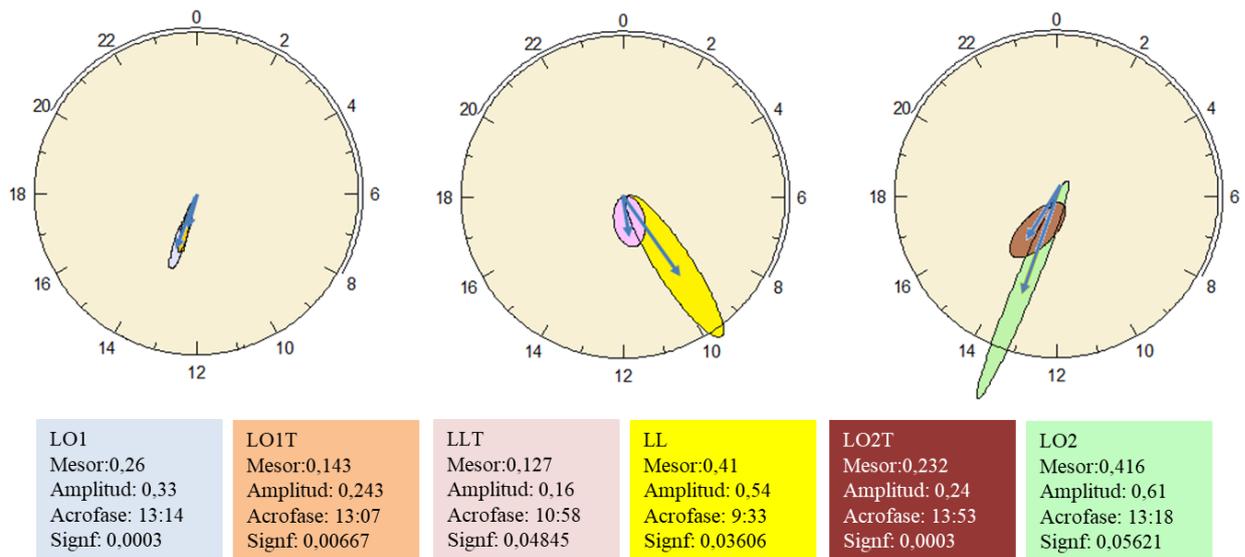
## 4.2 Determinación y comparación de parámetros cronobiológicos

La aplicación de la técnica del Cosinor permite el ajuste de los registros de actividad a una función cosenoidal y determinar distintos parámetros cronobiológicos. Su posterior representación gráfica nos permite comprobar si los ritmos ajustados son significativamente distintos entre sí.

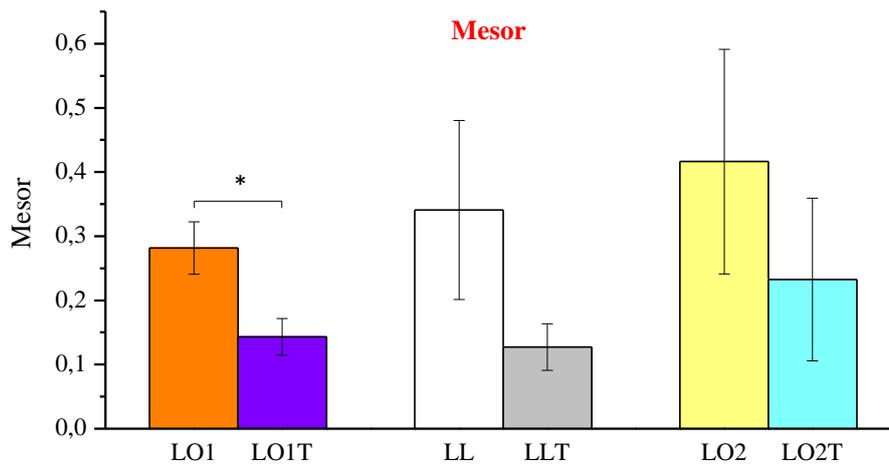
En primer lugar, se comprobó que se produce un retraso de fase de la actividad locomotora debido a la manifestación del ritmo endógeno de los animales en curso libre, con el ojo parietal descubierto. La no intersección de las elipses de confianza del 95% entre dos condiciones diferentes indica el resultado exitoso de una prueba de rechazo bilateral de la hipótesis nula ( $H_0$ : condición 1 = condición 2), entre fases relativas. Se observó que hay diferencias significativas en las acrofases entre condiciones de 12 horas de luz-12 horas de oscuridad y condiciones de curso libre, las cuales desaparecen cuando cesa el curso libre y se vuelven a las condiciones originales (Fig. 16). En segundo lugar, se determinó si los parámetros cronobiológicos entre las dos etapas experimentales y las distintas condiciones presentaban diferencias significativas (Fig. 17). Para ello, se recurrió al ya mencionado método de las elipses de error para comprar diferencias entre las acrofases y a una prueba t de Student de datos emparejados. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes parámetros estudiados (Fig. 18 y Fig. 19).



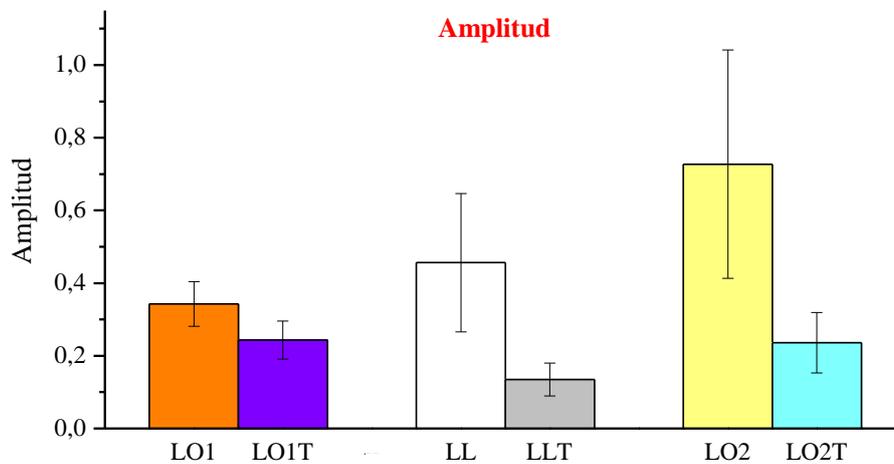
**Figura 16:** Determinación de distintos parámetros cronobiológicos del ritmo de actividad motora de *Gallotia gallotia* con el ojo parietal descubierto. La representación polar de la función Cosinor nos permite ver diferencias significativas entre las distintas acrofasas. En este caso, vemos que las acrofasas son significativamente distintas entre las condiciones de LO1 y LL, pero no entre LO1 y LO2 (LO1: primer periodo de luz-oscuridad; LL: periodo de luz-luz; LO2: segundo periodo de luz oscuridad). Las gráficas fueron elaboradas con el programa *Ritme v.6-c*.



**Figura 17:** Determinación de distintos parámetros cronobiológicos del ritmo de actividad motora de *Gallotia gallotia* con el ojo parietal tapado. La representación polar de la función Cosinor nos permite ver diferencias significativas entre las distintas acrofasas. La intersección de las elipses de error indica que no hay diferencias significativas entre las acrofasas de las condiciones estudiadas. LO1: primer periodo de luz-oscuridad; LL: periodo de luz-luz; LO2: segundo periodo de luz oscuridad. LO1T: primer periodo de luz-oscuridad con el ojo parietal tapado; LLT: periodo de luz-luz tapado; LO2T: segundo periodo de luz oscuridad tapado. Las gráficas fueron elaboradas con el programa *Ritme v.6-c*.



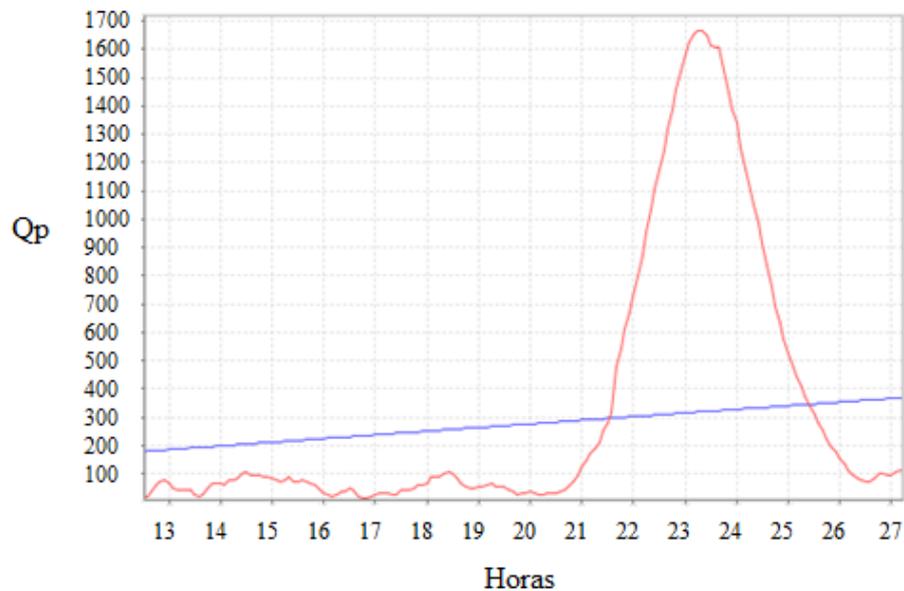
**Figura 18:** Comparación de los parámetros del mesor entre distintas condiciones experimentales. Se observaron diferencias significativas entre los mesores de las condiciones LO1 (M=0,281; SD=0,136) y LO1T (M=0,143; SD=0,095) ( $t(10) = 2,862$ ;  $p=0,017$ ). En cambio, no se observaron diferencias significativas entre las condiciones de LL (M=0,341; SD=0,462) y LLT (M=0,127; SD=0,03641) ( $t(10) = 1,426$ ;  $p=0,184$ ), ni entre las condiciones de LO2 (M=0,416; SD=0,581) y LO2T (M=0,232; SD=0,42) ( $t(10) = 0,851$ ;  $p=0,415$ ). Las gráficas representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de cada condición. LO1: primer periodo de luz-oscuridad; LL: periodo de luz-luz; LO2: segundo periodo de luz oscuridad. LO1T: primer periodo de luz-oscuridad con el ojo parietal tapado; LLT: periodo de luz-luz tapado; LO2T: segundo periodo de luz oscuridad tapado. \* $p < 0,05$ . La prueba estadística fue realizada mediante el programa OriginPro.



**Figura 19:** Comparación de la amplitud entre distintas condiciones experimentales. No se observaron diferencias significativas entre las amplitudes entre LO1 (M=0,343; SD=0,204) y LO1T (M=0,243; SD=0,174) ( $t(10) = 1,583$ ;  $p=0,144$ ), entre las amplitudes LL (M=0,456; SD=0,630) y LLT (M=0,135; SD=0,150) ( $t(10) = 1,604$ ;  $p=0,140$ ), ni entre las amplitudes entre LO2 (M=0,727; SD=1,043) y LO2T (M=0,236; SD=0,276) ( $t(10) = 1,675$ ;  $p=0,125$ ). Las gráficas representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de cada condición. LO1: primer periodo de luz-oscuridad; LL: periodo de luz-luz; LO2: segundo periodo de luz oscuridad. LO1T: primer periodo de luz-oscuridad con el ojo parietal tapado; LLT: periodo de luz-luz tapado; LO2T: segundo periodo de luz oscuridad tapado. \* $p < 0,05$ . La prueba estadística fue realizada mediante el programa OriginPro.

### 4.3 Cálculo del periodo en curso libre

Para calcular la periodicidad endógena a la que oscila la actividad locomotora de los animales en ausencia de sincronizadores exógenos ( $\tau$ ) se recurrió a la técnica del periodograma. En la Fig. 20 se ejemplifica la representación gráfica del periodograma, en el cual el pico por sobre de la línea de significación indica la presencia de un periodo significativo. En la Tabla 2 se recogen todas las  $\tau$  de los lagartos en las dos etapas experimentales. Los periodos calculados de cada lagarto en las diferentes condiciones experimentales fueron comparados con una prueba t de Student de datos emparejados para determinar diferencias entre estas.

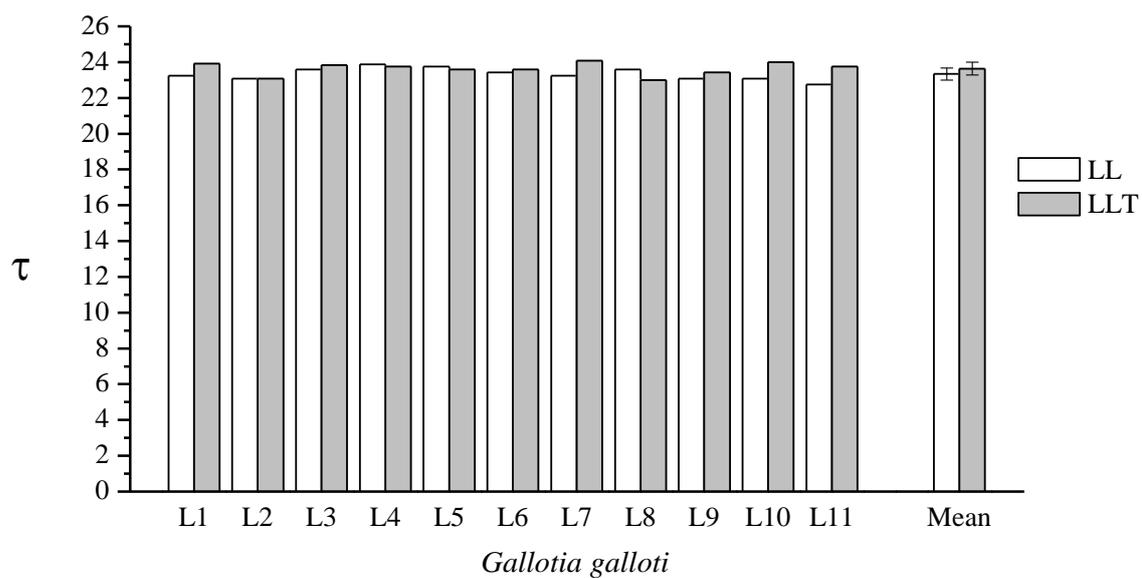


**Figura 20:** Ejemplo de periodograma del lagarto 1 en condiciones de LL con el ojo parietal descubierto. La línea roja indica la representación del periodograma y la línea azul indica el valor crítico que se debe superar para que un pico correspondiente a un periodo sea considerado estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ). El periodograma fue realizado mediante el programa Circadianware.

**Tabla 2:** Valor de  $\tau$  (en horas) de los distintos lagartos (L) en curso libre con ojo parietal descubierto (LL) y cubierto (LLT).

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11
LL	23,25	23,083	23,58	23,88	23,75	23,417	23,25	23,58	23,083	23,083	22,75
LLT	23,917	23,083	23,833	23,75	23,583	23,583	24,082	23	23,417	24	23,75

Viendo los valores recogidos en la Tabla 2 podemos apreciar que los valores de  $\tau$  se mueven en un rango de 22,75h-23,88h en las condiciones LL y de 23,083h-24h en las condiciones de LLT. En algunos lagartos el valor aumenta, en otros disminuye y en otros permanece constante. La aplicación de una prueba t de Student indica que no existen diferencias significativas en cuanto a la  $\tau$  en las distintas condiciones ( $t(10) = 2,2281$ ;  $p = 0,07906$ ), lo que sugiere que el ojo parietal no está implicado en la regulación de este parámetro.



**Figura 21:** Comparación de  $\tau$  en condiciones de 12 horas luz-12 horas luz con el ojo parietal destapado (LL) y con el ojo parietal tapado (LLT). La aplicación de una prueba t de Student indica que no existen diferencias entre las  $\tau$  en las distintas condiciones experimentales.

## 5. Discusión

---

Los resultados obtenidos en el presente estudio parecen indicar que la oclusión del ojo parietal en la especie *Gallotia galloti* no afecta a los ritmos diarios de actividad-reposo. Estos resultados contrastan con los resultados obtenidos por Molina-Borja (1996), que muestran que la extirpación de la glándula pineal, conectada con el ojo parietal a través del nervio parietal, producía arritmicidad en la misma especie, demostrando, entonces, el papel de la glándula pineal como marcapasos central. Los resultados de dicho estudio coinciden con los encontrados en la especie *Anolis carolinensis*, en que la pinealectomía produce arritmicidad en la actividad locomotora diaria en curso libre (Underwood, 1983). Ahora bien, otros estudios realizados con las especies *Sceloporus olivaceus* (Underwood, 1977), *Sceloporus occidentalis* (Underwood, 1981), *Iguana iguana* (Menaker y Tosini, 1996) y *Podarcis sicula* (Foà, 1991), muestran que la pinealectomía provoca cambios en la  $\tau$  de la actividad locomotora, en vez de producir arritmicidad. También es notable destacar que en *Dipsosaurus dorsalis* la pinealectomía no provoca ningún cambio en su ritmo circadiano de actividad locomotora diaria (Janik y Menaker, 1990). Nótese que, en todos estos estudios, los animales pinealectomizados también estaban desprovistos de su ojo parietal, ya que la extirpación de la glándula pineal sin dañar el ojo parietal no es posible.

Diversos estudios ponen de manifiesto que la melatonina, principal producto de la glándula pineal, sería la responsable de la sincronización de las oscilaciones circadianas en el sistema circadiano multioscilar de los lagartos. Por ejemplo, Underwood y Harless (1985) demuestran que los ritmos circadianos de actividad de *S. occidentalis*, con la glándula pineal intacta y en condiciones de luz constante, pueden encarrilarse a un periodo de 24h mediante la inyección de melatonina en días alternos a la misma hora. De igual modo, se observa que la inyección diaria de melatonina en lagartos pinealectomizados de la misma especie permite un encarrilamiento de la actividad a un periodo de 24h (Hyde y Underwood, 1995). La administración crónica de melatonina mediante cápsulas produce los mismos efectos en *P. sicula* (Foà, 1992).

En la literatura solo existen dos precedentes que han estudiado los efectos de cubrir el ojo parietal sobre la actividad locomotora diaria. El primero fue un estudio de Glaser (1958), que demostraba un aumento de la actividad de *Xantusia vigilis* tras la oclusión del ojo parietal. El segundo fue un estudio de Traeholt (1997), en que se estudió el efecto de la oclusión del ojo parietal en las especies *Varanus salvator* y *Varanus bengalensis*, que presentan un claro patrón de actividad diurna. En la primera especie, la cantidad y duración de la actividad locomotora disminuyó respecto a la que presentaban con el ojo descubierto, además de presentar un patrón anormal de actividad nocturna. Estos resultados serían similares a los obtenidos en nuestro estudio en la especie *Gallotia galloti*, en que la oclusión del ojo parietal provoca una disminución de la actividad media en periodo de luz-oscuridad, aunque esa disminución desaparece tras entrar en curso libre y su posterior retorno a las condiciones iniciales. En cambio, la oclusión del ojo parietal en la segunda especie no afectó a su ritmo de actividad locomotora, tal como hemos observado en el presente estudio a partir de que los animales entraran en curso libre. Un procedimiento que se puede considerar equivalente, en gran medida, a la oclusión del ojo parietal es la parietalectomía, es decir, la extirpación quirúrgica solamente del ojo parietal. En las especies *A. carolinensis* y *P. sicula* la parietalectomía no produce ningún cambio significativo en el ritmo circadiano de actividad locomotora diaria (Underwood, 1983; Innoceti, 1993), de manera análoga a los resultados obtenidos en este estudio. En cambio, en *I. iguana*, se observa un cambio en la  $\tau$  de la actividad locomotora circadiana.

En nuestro estudio, hemos observado que cubrir el ojo parietal no impide el encarrilamiento a ciclos de luz oscuridad, lo que pone de manifiesto que, en *Gallotia galloti*, el encarrilamiento a los ciclos ambientales también está mediado por otras estructuras fotorreceptoras, como las retinas. Esto contrastaría con estudios realizados en *A. carolinensis*, *S. olivaceus*, *Sceloporus magister*, *S. occidentalis*, *Sceloporus clarkii*, *X. vigilis*, *Hemidactylus turcicus*, *Coleonyx variegatus* e *I. iguana*, en que la extirpación de los ojos laterales en estas

especies no impide el encarrilamiento a ciclos de oscuridad ambiental, aunque en *S. olivaceus* se observa que, tras su cegamiento, la intensidad de luz necesaria para su encarrilamiento incrementa, lo que pone de manifiesto que, al menos en esta especie, los ojos laterales juegan un papel en el encarrilamiento a los ciclos de luz-oscuridad (Underwood y Menaker 1970, 1976; Underwood 1973, 1985; Foà, 1993). Sin embargo, la extirpación de la glándula pineal y el ojo parietal en *S. olivaceus*, *S. magister* y *P. sicula* con los ojos laterales extirpados tampoco impedía el encarrilamiento a los ciclos externos de luz-oscuridad (Underwood, 1973; Foà 1993), hecho que sugiere la presencia de otros tipos de fotorreceptores extrarretinales que pertineten el encarrilamiento de los ritmos circadianos y que el ojo parietal y/o la glándula pineal no son imprescindibles para el encarrilamiento de los ritmos de actividad locomotora (Underwood y Menaker, 1976). Estos fotorreceptores se han podido localizar, en *A. carolinensis* e *I. iguana*, en la región basal de los ventrículos laterales mediante el uso de anticuerpos anti-opsinas (Foster et al., 1994; Grace et al., 1996).

En nuestro estudio, partíamos de la hipótesis de que la fotorrecepción mediada por el ojo parietal era necesaria para el correcto funcionamiento de la glándula pineal debido a la conexión nerviosa que existe entre ambas estructuras, pero el hecho de que se mantuvieran los ritmos encarrilados tras la oclusión del ojo parietal muestra lo contrario. Los estudios que tratan la interacción de estas estructuras son escasos. Engbreston y Lent (1976), mediante una preparación aislada de ojo y glándula pineal, investigaron cómo las neuronas de la glándula respondían a niveles variables de serotonina y norepinefrina y cómo esa información se comunicaba al ojo parietal. Otro estudio demuestra como la actividad de la HIOMT en la glándula pineal está influenciada por los niveles de luz incidente tanto en el ojo parietal como en los ojos laterales, pero la respuesta mayoritaria estaba mediada por los ojos laterales (Bethea y Walker, 1978).

Viendo que el ojo parietal no está implicado en la regulación de los ritmos circadianos de actividad locomotora, es plausible suponer que juega un papel fisiológico diferente. Se han realizado numerosos estudios en distintas especies que muestran que la oclusión del ojo parietal y la pariealectomía afectan a la temperatura corporal y al comportamiento termorregulador. Por ejemplo, se ha observado que la oclusión del ojo parietal en *S. occidentalis* y en *Crotaphytus collaris* provoca un aumento de la temperatura basal corporal de los animales (Stebbins y Eakin 1958; Sievert y Hutchinson, 1989), mientras que en *Lacerta viridis* produce una disminución de la temperatura basal (Rismiller, 1897). Además, en *Phrysonoma douglassi* la oclusión del ojo parietal provoca un aumento del punto de referencia termorregulatorio, es decir, la temperatura corporal a partir de la cual se comienza el comportamiento termorregulatorio (Philips et al., 1980).

## 6. Conclusiones

---

- Los lagartos de la especie *Gallotia galloti*, en condiciones de LO, presentan un ritmo encarrilado a las condiciones lumínicas experimentales.
- Al cambiarse las condiciones a LL, presentan un retraso de fase, que desaparece cuando se retoman las condiciones iniciales.
- La oclusión del ojo parietal no altera la capacidad de encarrilamiento ni el retraso de fase de esta especie, lo que sugiere que la glándula pineal presenta otras vías de recepción de información fótica, además del ojo parietal.
- El ritmo endógeno ( $\tau$ ) que presentan los lagartos es variable entre los distintos individuos, sin ser significativamente diferentes entre las distintas condiciones experimentales.
- La implicación del ojo parietal en los distintos parámetros cronobiológicos es mínima y, probablemente, esté implicado en otra función fisiológica.

## 7. Bibliografía

---

1. Aschoff, J. (1983). Circadian control of body temperature. *Journal of Thermal Biology*, 8(1), 143–147.
2. Benarroch, E. E. (2008). Suprachiasmatic nucleus and melatonin. *Neurology*, 71(8), 594–598.
3. Bethea, C. L., & Walker, R. F. (1978). Parietal Eye-Pineal Gland Interactions in the Lizard *Sceloporus occidentalis* (Reptilia, Lacertilis, Iguanidae). *Journal of Herpetology*, 12(1), 83–87.
4. Chiba, Y., Cutkomp, L. K., & Halberg, F. (1973). Circaseptan (7-day) oviposition rhythm and growth of spring tail, *Folsomia Candida* (Collembola: Isotomidae). *Journal of Interdisciplinary Cycle Research*, 4(1), 59–66.
5. Cirelli, C., & Tononi, G. (2008). Is Sleep Essential? *PLOS Biology*, 6(8), e216.
6. Claustrat, B., Brun, J., & Chazot, G. (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews*, 9(1), 11–24.
7. Crnko, S., Du Pré, B. C., Sluijter, J. P. G., & Van Laake, L. W. (2019). Circadian rhythms and the molecular clock in cardiovascular biology and disease. *Nature Reviews Cardiology*, 16(7), 437–447.
8. Dubocovich, M. L., Delagrange, P., Krause, D. N., Sugden, D., Cardinali, D. P., & Olcese, J. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, Classification, and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 343–380.
9. España, R. A., & Scammell, T. E. (2011). Sleep Neurobiology from a Clinical Perspective. *Sleep*, 34(7), 845–858.
10. Feng, N. Y., & Bass, A. H. (2016). “Singing” Fish Rely on Circadian Rhythm and Melatonin for the Timing of Nocturnal Courtship Vocalization. *Current Biology*, 26(19), 2681–2689.
11. Foà, A. (1991). The role of the pineal and the retinae in the expression of circadian locomotor rhythmicity in the ruin lizard, *Podarcis sicula*. *Journal of Comparative Physiology A*, 169(2), 201–207.
12. Foster, R. G., Grace, M. S., Provencio, I., Degrip, W. J., & Garcia-Fernandez, J. (1994). Identification of vertebrate deep brain photoreceptors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 18(4), 541–546.
13. Gamble, K. L., Berry, R., Frank, S. J., & Young, M. E. (2014). Circadian clock control of endocrine factors. *Nature Reviews Endocrinology*, 10, 466.
14. Glaser, R. (1958). Increase in Locomotor Activity Following Shielding of the Parietal Eye in Night Lizards. *Science*, 128(3338), 1577 LP – 1578.
15. Golombek, D. (2007). *Cronobiología humana: ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad* (2nd ed.). Bernal: Universidad de Quimiles.
16. Golombek, D. A., & Yannieli, P. (2006). Organización del sistema circadiano en vertebrados. In J. A. Madrid Pérez & M. de los Á. Rol de Lama (Eds.), *Cronobiología básica y clínica* (pp. 191–222). Madrid: Editec red.
17. Grace, M. S., Alones, V., Menaker, M., & Foster, R. G. (1996). Light perception in the vertebrate brain: An ultrastructural analysis of opsin- and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in iguanid lizards. *Journal of Comparative Neurology*, 367(4), 575–594.
18. Guy, B., Noam, B.-S., Yotam, C., & Rachel, G. (2017). Time is honey: circadian clocks of bees and flowers and how their interactions may influence ecological communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1734).
19. Innocenti, A., Bertolucci, C., Minutini, L., & Foà, A. (1996). Seasonal variations of pineal involvement in the circadian organization of the ruin lizard *Podarcis sicula*. *Journal of Experimental Biology*, 199(5), 1189–1194.
20. Janik, D. S., Pickard, G. E., & Menaker, M. (1990). Circadian locomotor rhythms in the desert iguana. *Journal of Comparative Physiology A*, 166(6), 811–816.
21. Joiner, W. J. (2016). Unraveling the Evolutionary Determinants of Sleep. *Current Biology*, 26(20), R1073–R1087.
22. Kripke, D. F. (1972). An Ultradian Biologic Rhythm Associated with Perceptual Deprivation and REM Sleep. *Psychosomatic Medicine*, 34(3).
23. Libourel, P.-A., Barrillot, B., Arthaud, S., Massot, B., Morel, A.-L., Beuf, O., ... Luppi, P.-H. (2018). Partial homologies between sleep states in lizards, mammals, and birds suggest a complex evolution of sleep states in amniotes. *PLOS Biology*, 16(10), 1–28.
24. Litwack, G. (2018). Metabolism of Amino Acids. En *Human Biochemistry* (1ª ed., pp. 359–394).
25. Menaker, M. (2014). Neurobiology: The Eye within the Brain. *Current Biology*, 24(13), R613–R615.
26. Michael, M. (2002). Biological Clocks at the End of the 20th Century. En K. Vinod (Ed.), *Biological Rhythms* (1ª ed., pp. 1–4).

27. Miyazaki, S., Liu, C.-Y., & Hayashi, Y. (2017). Sleep in vertebrate and invertebrate animals, and insights into the function and evolution of sleep. *Neuroscience Research*, *118*, 3–12.
28. Molina-Borja, M. (1996). Pineal Gland and Circadian Locomotor Activity Rhythm in the Lacertid *Gallotia galloti eisentrauti*: Pinealectomy Induces Arrhythmicity. *Biological Rhythm Research*, *27*(1), 1–11.
29. Nicolau, M. C., Akaârîr, M., Gamundí, A., González, J., & Rial, R. V. (2000). Why we sleep: the evolutionary pathway to the mammalian sleep. *Progress in Neurobiology*, *62*(4), 379–406.
30. Noguera Díez, A. (2006). Representación gráfica y análisis de datos en cronobiología. En J. A. Madrid & Á. Rol de Lama (Eds.), *Cronobiología básica y clínica* (1ª ed., pp. 83–120). Madrid: Editec red.
31. Papastergiou, G. I., Schmid, G. F., Riva, C. E., Mendel, M. J., Stone, R. A., & Laties, A. M. (1998). Ocular Axial Length and Choroidal Thickness in Newly Hatched Chicks and One-year-old Chickens Fluctuate in a Diurnal Pattern that is Influenced by Visual Experience and Intraocular Pressure Changes. *Experimental Eye Research*, *66*(2), 195–205.
32. Pati, A. (2001). Chronobiology: The Dimension of Time in Biology and Medicine. *Proc. Indian National Science Academy (PNSA)*, *B67*(6), 323–372.
33. Patton, A. P., & Hastings, M. H. (2018). The suprachiasmatic nucleus. *Current Biology*, *28*(15), R816–R822.
34. Peirson, S. N., Halford, S., & Foster, R. G. (2009). The evolution of irradiance detection: melanopsin and the non-visual opsins. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *364*(1531), 2849–2865.
35. Philipps, J. A., Harlow, H. J., & Ra. (1980). Thermoregulation, Set-point shifts of behavioral Manipulation, in horned lizards after parietal eye. *American Zoologist*, *20*(4), 732.
36. Ralph, M. R., & Lehman, M. N. (1991). Transplantation: a new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker. *Trends in Neurosciences*, *14*(8), 362–366.
37. Rattenborg, N., A Lesku, J., Martinez, D., & L Lima, S. (2007). The non-trivial functions of sleep. *Sleep Medicine Reviews*, *11*, 405-9
38. Rechtschaffen, A., & Kales, A. (1968). A Manual of Standardized Terminology: Techniques and Scoring System for Sleep Stages of Human Subjects. Los Angeles: UCLA Brain Information/Brain Research Institute.
39. Rial, R. V., Akaârîr, M., Gamundí, A., Nicolau, C., Garau, C., Aparicio, S., ... Esteban, S. (2010). Evolution of wakefulness, sleep and hibernation: From reptiles to mammals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *34*(8), 1144–1160.
40. Rial, R. V., Nicolau, M. C., Gamundí, A., Akaârîr, M., Aparicio, S., Garau, C., ... Esteban, S. (2007). The trivial function of sleep. *Sleep Medicine Reviews*, *11*(4), 311–325.
41. Rismiller, P. D., & Heldmaier, G. (1987). Melatonin and photoperiod affect body temperature selection in the lizard *Lacerta viridis*. *Journal of Thermal Biology*, *12*(2), 131–134.
42. Sheeba, V., Sharma, V. K., & Joshi, A. (1999). Adaptive significance of circadian rhythms. *Resonance*, *4*(1), 73–75.
43. Shein-Idelson, M., Ondracek, J. M., Liaw, H.-P., Reiter, S., & Laurent, G. (2016). Slow waves, sharp waves, ripples, and REM in sleeping dragons. *Science*, *352*(6285), 590–595.
44. Siegel, J. M. (2009). Sleep viewed as a state of adaptive inactivity. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*, 747.
45. Sievert, L. M., & Hutchison, V. H. (1989). The parietal eye and thermoregulatory behavior of *Crotaphytus collaris* (Squamata: Iguanidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, *94*(2), 339–343.
46. Sokolove, P. G., & Bushell, W. N. (1978). The chi square periodogram: Its utility for analysis of circadian rhythms. *Journal of Theoretical Biology*, *72*(1), 131–160.
47. Solessio, E., & Engbretson, G. A. (1993). Antagonistic chromatic mechanisms in photoreceptors of the parietal eye of lizards. *Nature*, *364*(6436), 442-445.
48. Spruyt, E., Verbelen, J.-P., & De Greef, J. A. (1988). Ultradian and circannual rhythmicity in germination of *Phaseolus* seeds. *Journal of Plant Physiology*, *132*(2), 234–238.
49. Stephan, F. K., & Zucker, I. (1972). Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *69*(6), 1583–1586.
50. Stillman, J. H., & Barnwell, F. H. (2004). Relationship of daily and circatidal activity rhythms of the fiddler crab, *Uca princeps*, to the harmonic structure of semidiurnal and mixed tides. *Marine Biology*, *144*(3), 473–482.
51. Tosches, M. A., Bucher, D., Vopalensky, P., & Arendt, D. (2014). Melatonin Signaling Controls Circadian Swimming Behavior in Marine Zooplankton. *Cell*, *159*(1), 46–57.

52. Tosini, G., & Menaker, M. (1996). The pineal complex and melatonin affect the expression of the daily rhythm of behavioral thermoregulation in the green iguana. *Journal of Comparative Physiology A*, 179(1), 135–142.
53. Tosini, G. (1997). The pineal complex of reptiles: physiological and behavioral roles. *Ethology Ecology & Evolution*, 9(4), 313–333.
54. Tosini, G., & Avery, R. (1996). Spectral composition of light influences thermoregulatory behaviour in a lacertid lizard (*Podarcis muralis*). *Journal of Thermal Biology*, 21(3), 191–195.
55. Underwood, H. (1977). Circadian organization in lizards: the role of the pineal organ. *Science*, 195(4278), 587 LP – 589.
56. Underwood, H. (1981). Circadian organization in the lizard *Sceloporus occidentalis*: The effects of pinealectomy, blinding, and melatonin. *Journal of Comparative Physiology*, 141(4), 537–547.
57. Underwood, H. (1973). Retinal and extraretinal photoreceptors mediate entrainment of the circadian locomotor rhythm in lizards. *Journal of Comparative Physiology*, 83(2), 187–222.
58. Underwood, H. (1983). Circadian organization in the lizard *Anolis carolinensis*: a multioscillator system. *Journal of Comparative Physiology*, 152(2), 265–274.
59. Underwood, H., & Harless, M. (1985). Entrainment of the circadian activity rhythm of a lizard to melatonin injections. *Physiology & Behavior*, 35(2), 267–270.
60. Underwood, H., & Menaker, M. (1976). Extraretinal photoreception in lizards. *Photochemistry and Photobiology*, 23(4), 227–243.
61. Underwood, H., & Menaker, M. (1970). Extraretinal Light Perception: Entrainment of the Biological Clock Controlling Lizard Locomotor Activity. *Science*, 170(3954), 190 LP – 193.
62. Valentinuzzi, V. S., & Oda, G. A. (2016). The timekeeping system: a key organizational element. En *Series on Bioengineering and Biomedical Engineering: Vol. 7. Further Understanding of the Human Machine* (pp. 357–389).
63. Vaze, K. M., & Sharma, V. K. (2013). On the Adaptive Significance of Circadian Clocks for Their Owners. *Chronobiology International*, 30(4), 413–433.
64. Vega, A. (1993). Análisis estadístico en cronobiología. *Psiquis*, 2(6), 139–149.
65. Verwey, M., Robinson, B., & Amir, S. (2013). Recording and Analysis of Circadian Rhythms in Running-wheel Activity in Rodents. *JoVE*, (71), e50186.
66. Yerushalmi, S., & Green, R. M. (2009). Evidence for the adaptive significance of circadian rhythms. *Ecology Letters*, 12(9), 970–981.
67. Zantke, J., Ishikawa-Fujiwara, T., Arboleda, E., Lohs, C., Schipany, K., Hallay, N., ... Tessmar-Raible, K. (2013). Circadian and Circalunar Clock Interactions in a Marine Annelid. *Cell Reports*, 5(1), 99–113.

## 8. Agradecimientos

---

Quisiera agradecer a mis compañeros Ana Dunjó Arribas y Alfonso García da Vila su compañía y ayuda, sin la cual este trabajo no se podría haber sacado adelante.

También quisiera agradecer al Dr. Mourad Akaârir su paciencia y sus consejos para la finalización de este trabajo.

Finalmente quiero agradecer al resto de miembros del grupo de Neurofisiología del Sueño y Ritmos Biológicos, los cuales han sido muy acogedores y han permitido adentrarme en el mundo académico universitario.

