



# Universitat de les Illes Balears

Facultad de Ciencias

## Memoria del Trabajo de Fin de Grado.

Función del órgano pineal en la regulación del ritmo circadiano del lacértido *Gallotia galloti*.

Ana Dunjó Arribas

Grado de Biología

Año académico 2018-19

Trabajo tutelado por Mourad Akaarir El Ghourri.

Departamento de Biología.

Se autoriza a la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto i difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas i de investigación.	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Palabras clave: *Gallotia galloti*, ritmo circadiano, órgano pineal, ojo parietal, núcleo supraquiasmático, sueño-vigilia. Luz-oscuridad.



## **Agradecimientos.**

Quisiera agradecer la compañía, el apoyo y la ayuda de mis compañeros de TFG Jaume Coll Ferragut y Alfonso García da Vila, sin ellos no podría haber sacado este trabajo adelante. Además, quiero agradecer al equipo de Neurofisiología, del departamento de Biología de la UIB, en especial al Dr. Mourad Akaarir El Ghourri, por darme las directrices necesarias para la elaboración de este estudio.

También quisiera dar las gracias a mis padres Felicia Arribas Carrillo y Juan Dunjó Codina, y a mi hermano Juan Dunjó Arribas, por su apoyo incondicional, y por permitirme la oportunidad de cursar un grado universitario. Sin ellos no sería lo que soy.

# ÍNDICE

<b>Resumen</b>	<b>5</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>7</b>
1.1. Ritmos circadianos.	
1.2. Carácter endógeno de los ritmos circadianos.	
1.3. Regulación de los ritmos circadianos. El Núcleo Supraquiasmático	
1.4. Melatonina endógena y ritmo sueño-vigilia.	
1.5. Órgano Pineal y el ojo parietal.	
<b>2. Hipótesis y objetivos</b>	<b>15</b>
<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>16</b>
3.1. Animales.	
3.2. Metodología.	
3.3. Análisis de datos.	
<b>4. Resultados y Discusión</b>	<b>19</b>
4.1. Actogramas	
4.2. Método del Cosinor.	
<b>5. Discusión</b>	<b>26</b>
<b>6. Conclusión</b>	<b>27</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>28</b>

## Resumen.

Los ritmos circadianos son oscilaciones de las variables biológicas en intervalos regulares de tiempo. La selección natural ha favorecido la evolución de los ritmos circadianos ya que un animal que ajuste su actividad de acuerdo con las circunstancias ambientales más favorables presentará una clara ventaja evolutiva. Si le proporcionamos a un individuo un ambiente artificial constante, los ritmos circadianos persisten demostrando su carácter endógeno, pero entra en el ritmo de curso libre (*free running rhythm*).

El ojo parietal forma parte del epítalamo, se trata de un órgano fotorreceptor y está asociado comúnmente con la glándula pineal regulando el ritmo circadiano y la producción hormonal para la termorregulación. En referencia al sistema circadiano, el órgano pineal tiene un papel importante en la regulación de los ritmos. Se ha demostrado que, a través de la pinealectomía, se producen cambios marcados en los períodos de curso libre y arritmias en lagartos.

La hipótesis de este estudio se basa en el efecto de que al cubrir el ojo parietal, se bloquearía la llegada de la estimulación lumínica ambiental a la glándula pineal, lo que provocaría un desajuste pronunciado en el ritmo actividad-inactividad. En el caso de que no se produzca esta desincronización tan pronunciada, habrá que considerar que hay otra u otras vías que sincronizan el ritmo actividad-inactividad en esta especie. El objetivo principal de este trabajo es comprobar, sin proceder a una pinealectomía, la función del órgano pineal en la regulación del ritmo circadiano del lacértido *Gallotia galloti*.

El experimento consistió en registrar el ritmo circadiano de los lagartos en 3 ciclos diferentes. Un primer ciclo consistió en 12 horas de luz y oscuridad, en el segundo ciclo se mantuvieron 24h de luz constante y en el tercer ciclo se volvió a las condiciones del primer ciclo. La segunda parte del experimento consistió en realizar el mismo procedimiento, pero esta vez tapando el órgano parietal del animal. Para el análisis de datos se utilizaron análisis estadísticos, actogramas y el método del Cosinor. Los resultados obtenidos sugieren que el ojo parietal en la especie *Gallotia galloti* no es el mecanismo principal por el cual la glándula pineal recibe información lumínica del entorno. Si no que, cabría suponer que en estos animales existen otras vías de señalización.

## **Abstract.**

Circadian rhythms are the oscillations of biological variables at regular intervals of time. Natural selection has favored the evolution of circadian rhythms and animals that adjust to the activity according to the most favorable environmental circumstances. However, the circadian rhythms persist demonstrating their endogenous character, but enter the rhythm of the free course “free running rhythm”.

The parietal eye is part of the epithalamus, it is a photoreceptor organ and is associated with the pineal gland, regulating the circadian rhythm and hormonal production for thermoregulation. In reference to the circadian system, the pineal organ plays an important role in the regulation of rhythms. It has been shown that, through pinealectomy, marked changes have occurred in the periods of free course and arrhythmias in lizards.

The hypothesis of this study is based on the effect of covering the parietal eye, blocking the arrival of the environmental light estimation to the pineal gland, which would cause a pronounced imbalance in the activity-inactivity rhythm. In the event that this pronounced desynchronization does not occur, it will be necessary to consider that there are other or other ways that synchronize the activity-inactivity rhythm in this species. The function of the pineal organ in the regulation of the circadian rhythm of the lizard *Gallotia galloti*.

The experiment consisted in recording the circadian rhythm of the lizards in 3 different cycles. A first cycle consisted of 12 hours of light and dark, in the second cycle they were maintained in 24 hours of constant light and in the third cycle they returned to the conditions of the first cycle.

The second part of the experiment consisted of performing the same procedure, but this time the parietal organ of the animal. For the analysis of the data, statistical analyzes, actograms and the cosinor method are used. The results indicate that the parietal eye in the *Gallotia galloti* species is not the main mechanism by which the pineal gland receives light information from the environment. If not, it could be assumed that there are signaling pathways in these animals.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Ritmos biológicos

La rotación de la Tierra alrededor de su eje en 24 horas causa cambios predecibles en el ambiente. La Cronobiología (del griego Kronos= tiempo; bios=vida and logos=ciencia) es la disciplina científica que estudia los cambios rítmicos (ritmos biológicos) en los distintos niveles de organización de los organismos [Moore-Ede MC et al., 1998]. Un ritmo biológico es la recurrencia de un fenómeno biológico en intervalos regulares. Entre los parámetros que caracterizan un ritmo biológico los más utilizados son: el periodo, que es el tiempo que se tarda en completar la oscilación, y su inversa, la frecuencia, que se corresponde con el número de ciclos por unidad de tiempo. En Cronobiología, la unidad de frecuencia más utilizada es el día. En este sentido, los ritmos se pueden clasificar como circadianos, con una frecuencia cercana al día (entre >20 y <28 h), ultradianos, con una frecuencia superior a un ciclo por día (<20 h) e infradianos, que son aquellos con una frecuencia menor de un ciclo por día (>28 h). Entre estos últimos se encuentran los ritmos circalunares ( $\approx$  28 días), circanuales (365 días) y los circaseptanos (7 años)

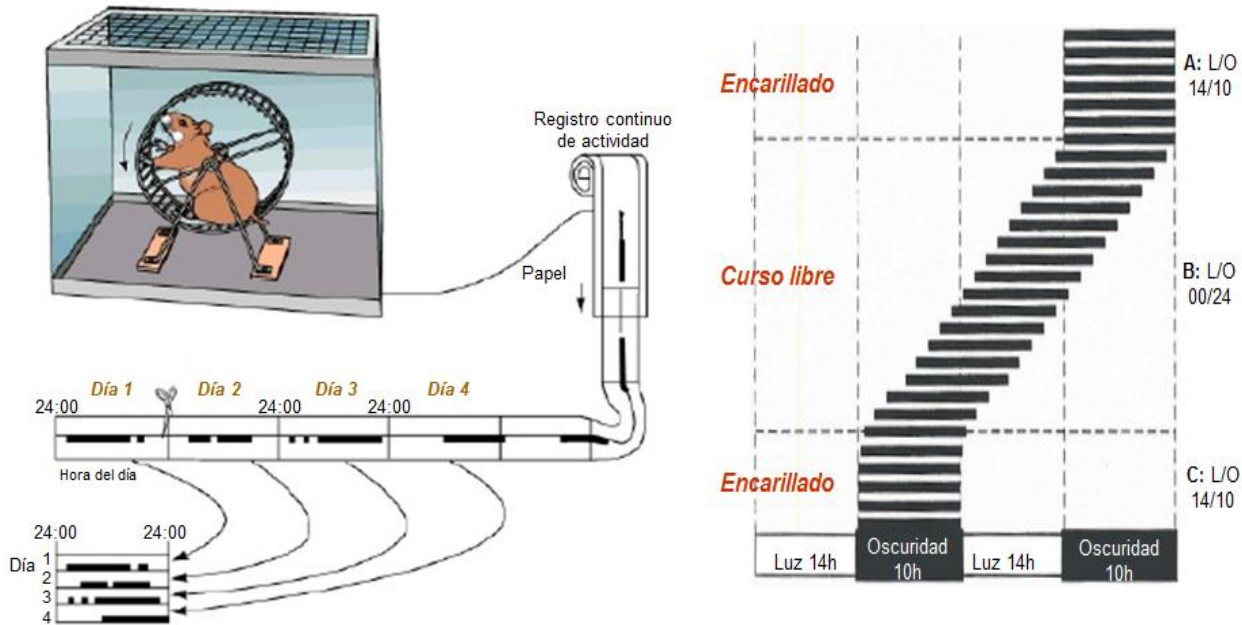
## 1.2. Ritmos circadianos

Tanto humanos, animales y plantas como organismos unicelulares presentan un reloj biológico (reloj circadiano) que les permite adaptar sus ciclos de actividad inactividad a las oscilaciones ambientales diarias [Mailloux et al, 1999]. La selección natural ha favorecido la evolución de los ritmos circadianos ya que un animal que ajuste su actividad de acuerdo con las circunstancias ambientales más favorables presentará una clara ventaja sobre otro que, por ejemplo, permanezca activo continuamente. [Aschoff 1964]. Se ha demostrado mediante experimentos con lagartos, pollos y moscas que los ritmos circadianos son innatos [Aschoff et al, 1967]. El termino *circadiano* fue introducido por Halberg en 1954 y se refiere a que el periodo del reloj es de aproximadamente 24 horas y funciona constantemente.

Los ritmos circadianos pueden sincronizarse con señales periódicas del ambiente, conocidas como *Zeitgebers*. Si los ritmos fisiológicos fueran una simple reacción a los *Zeitgebers*, desaparecerían cuando el organismo se sometiese a condiciones ambientales constantes. Sin embargo, la mayor parte de los ritmos estudiados hasta el momento son endógenos, es decir, no están dirigidos por una variable externa sino por un mecanismo interno [Aschoff; 1960, 1964].

Si le proporcionamos a un individuo un ambiente artificial constante, es decir, si eliminamos su *Zeitgeber*, los ritmos circadianos persisten demostrando su carácter endógeno, pero el animal entra en el ritmo de curso libre (*free running rhythm*). Un animal en condiciones normales de luz-oscuridad presenta un ritmo de 24 horas ya que puede distinguir los cambios en la iluminación y ajustar su ciclo actividad-inactividad [Aschoff, 1964, 1979, Moore-Ede et al 1982]. El periodo del ritmo en *freerunning* recibe el nombre de *tau* [Rol de Lama, M, et al, 2006]. En *freerunning rhythm* el animal altera *tau* adelantando o retrasando el ciclo unas horas y, por lo tanto, presenta

un periodo ligeramente inferior o superior a 24 horas ya que mantiene sus ritmos de actividad-reposo con un día y noche subjetivos (Ilustración 1) [Aschoff, 1964, Achoff 1979, Moore-Ede et al 1982].



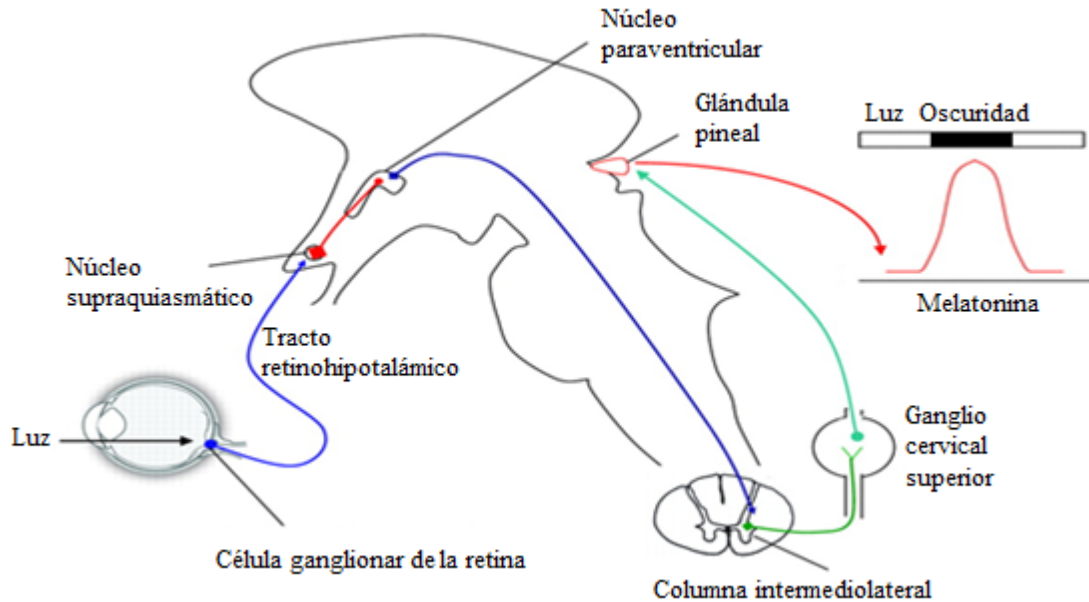
**Ilustración 1.** Actograma que describe el ritmo diario de actividad locomotora de un hámster.

## 1.2. Organización del sistema circadiano

En los vertebrados mamíferos, los ritmos circadianos son generados y sincronizados por un oscilador circadiano llamado núcleo supraquiasmático (NSQ) [Aguilar-Roblero et al., 1998] que se encuentra en la parte anterior del hipotálamo [Saper et al, 2005]. En circunstancias normales el NSQ se restablece diariamente mediante los aportes de luz desde la retina durante el día y por la secreción de melatonina durante la noche [Johnson R., et al., 1988]. La señal lumínica es recibida por el NSQ (**Ilustración 2**) mediante una red especializada de células ganglionares de la retina sensibles a la melanopsina. Estas señales de temporización sincronizan el reloj con el ciclo externo día-noche [Reppert et al, 2002; Googley J, et al., 2003]. Las células ganglionares forman una ruta que recibe el nombre de tracto retinohipotalámico (TRH). Si se produce la lesión del TRH se impide que el NSQ se ajuste a los ciclos de luz [Guadarrama-Ortiz et al, 2014].

Los núcleos supraquiasmáticos, de aproximadamente 20.000 neuronas, actúan a modo de marcapasos, integrando la información recibida y regulando áreas del cerebro implicadas en otras funciones del organismo: ritmo de temperatura corporal central, ritmo de actividad-reposo, sistema endocrino, sistema nervioso autónomo, ánimo, comportamiento, etc. [Lucas-Sánchez et al, 2012].



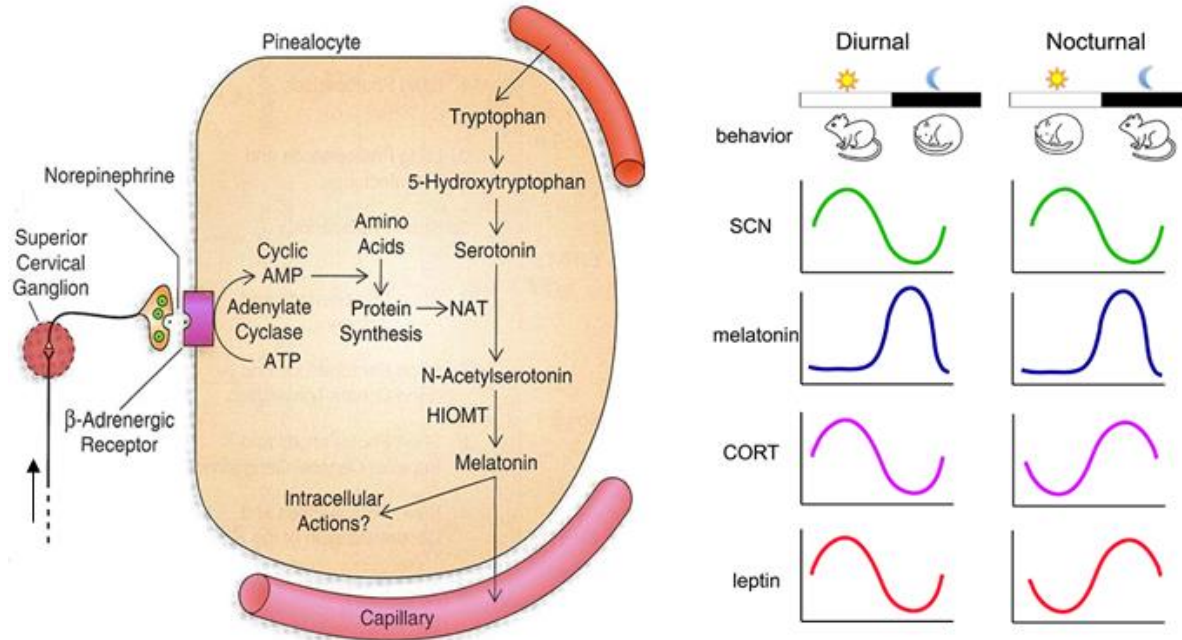


**Ilustración 2.** Vía de regulación de la glándula pineal por estímulos luminosos. Tracto retino-hipotalámico, conexión Núcleo supraquiasmático–Glándula pineal.

La responsable de la sincronización de los ritmos biológicos con el ciclo luz-oscuridad es la melatonina, una hormona que actúa sobre áreas del cerebro y tiene funciones en el control de secreción de hormonas y otros procesos fisiológicos y conductuales [Fernández J., 2010].

La melatonina es sintetizada en la glándula pineal principalmente. La información luz-oscuridad proveniente del NSQ llega a la glándula pineal y es aquí donde se sintetiza la principal hormona implicada en la regulación de los ritmos circadianos. Se sintetiza durante la ausencia de luz y, por tanto, sus niveles son elevados durante en el periodo nocturno (**Ilustración 2**). Si bien la melatonina se sintetiza en la glándula pineal, independientemente si el animal es diurno o nocturno (**Ilustración 3**), se han descrito otras áreas extrapineales capaces de sintetizarla [Carpentieri AR, 2015].

La melatonina tiene propiedades cronobióticas, es decir, ejerce una regulación sobre los ritmos circadianos y es responsable de la regulación del ciclo sueño-vigilia. Además, se ha visto que tiene una función en la maduración sexual de algunos animales y que tiene una capacidad antioxidante, actuando como neutralizador de radicales libres y potenciando enzimas antioxidantes. También se le reconocen propiedades oncostáticas e inmunomoduladoras [Guerrero JM, 2007].

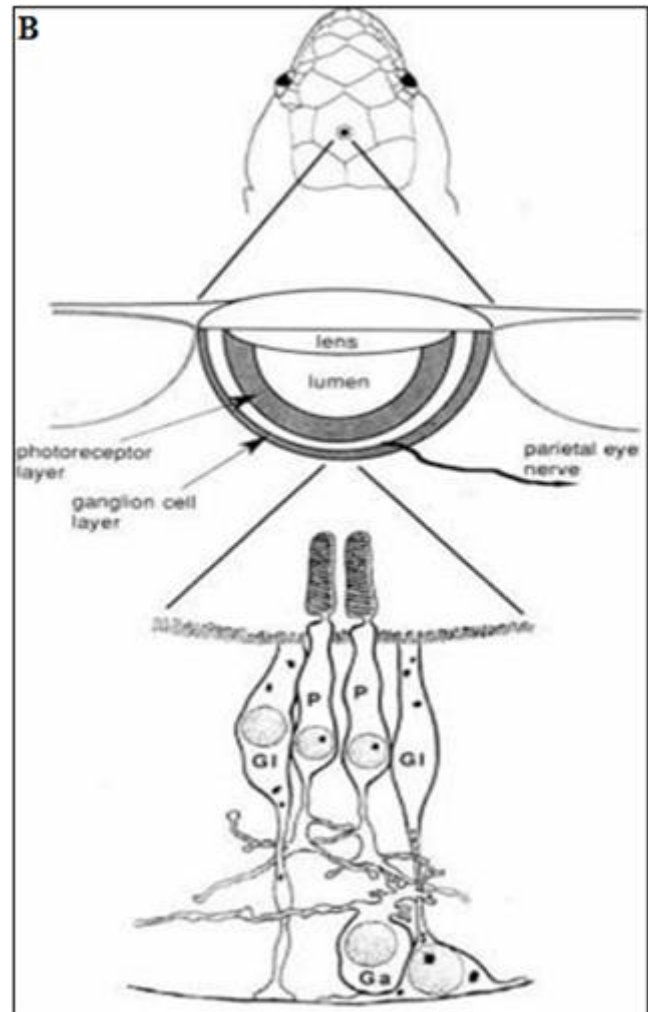


**Ilustración 3.** Izquierda: Biosíntesis de melatonina. Las enzimas N-acetyltransferase (NAT) y hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) son las enzimas clave en la ritmicidad de la producción de melatonina por los pinealocitos. Derecha: En todas las especies estudiadas (tanto de actividad diurna como nocturna) los niveles de melatonina son mínimos durante el día y se incrementan de forma brusca durante las horas de oscuridad.

#### 1.4. El ojo parietal.

El ojo parietal (**Ilustración 4**) forma parte del epítalamo, el cual está dividido en dos partes: el epífisis (el órgano pineal, o glándula pineal) y el órgano parietal, también llamado ojo parietal o tercer ojo si es fotorreceptor. Este surge como una evaginación del órgano pineal o como una raíz del diencefalo. En algunas especies, este sobresale a través del cráneo [Zug, G. et al., 2002]. El ojo puede ser fotorreceptor y está asociado comúnmente con la glándula pineal regulando el ritmo circadiano y la producción hormonal para la termorregulación.

El ojo parietal puede estar dotado de una pequeña córnea, un cristalino y un área formada por células fotorreceptoras que conectan mediante sinapsis con las células ganglionares próximas que, a su vez originan un nervio que va hasta el sistema nervioso central [Kardong, 1998].



#### Ilustración 4.

A. Señalización del órgano Parietal en el lacértido *Gallotia galloti*. B. El ojo parietal de los lagartos está localizado en un pequeño foramen entre los huesos parietales. La lente esta justo debajo de una cornea transparente. Entre la lente y la retina se encuentra el lumen. Por debajo se puede observar la región ganglionar en la cual encontramos las células fotorreceptoras

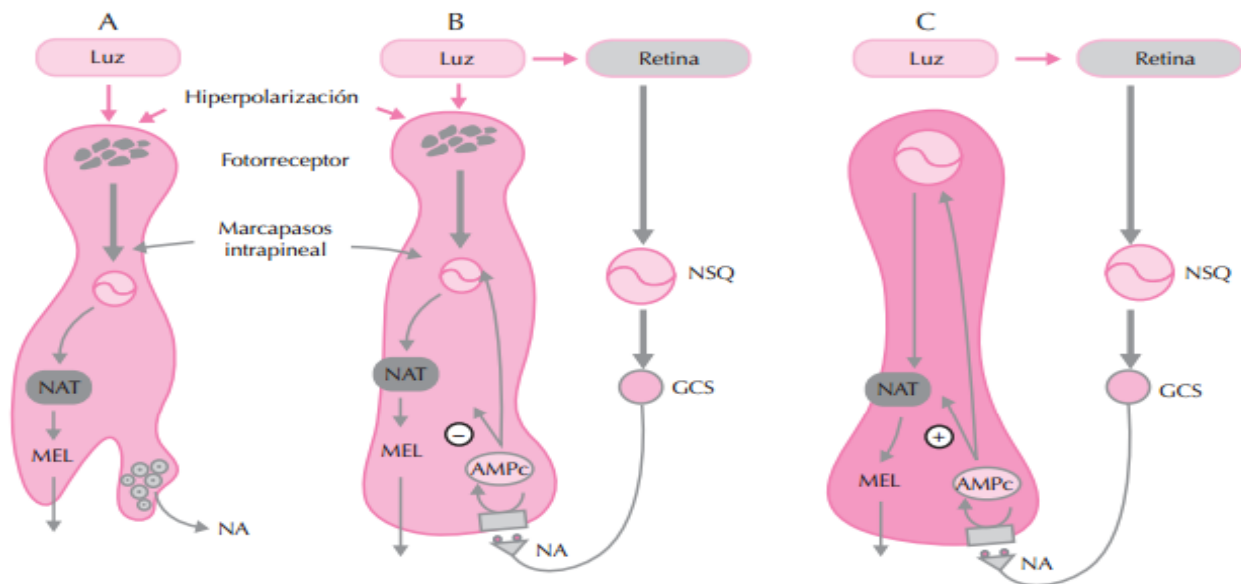
El primitivo complejo pineal era un órgano fotorreceptor. En la mayoría de los ciclóstomos, los peces, los anfibios y los reptiles se ha podido demostrar experimentalmente la naturaleza fotorreceptora del complejo pineal. Las células fotorreceptoras del complejo pineal son alargadas, tienen aspecto columnar y poseen una prolongación apical especializada. Estas células conectan con su región basal y mediante sinapsis con las células ganglionares próximas. A partir de estas últimas se origina el nervio pineal por el que los impulsos viajan hasta la habénula y hacia otras regiones del encéfalo [Kardong, 1998].

En referencia al sistema circadiano, el órgano pineal tiene un papel importante. A través de la pinealectomía, proceso quirúrgico por el cual se extirpa la glándula pineal, se ven los efectos como cambios marcados en los períodos de curso libre y arritmias en lagartos. Es importante destacar que la hormona pineal, la melatonina, desempeña un papel importante en el sistema circadiano [Underwood, 1989].

En la especie *Sceloporus occidentalis* se han llevado a cabo diversos estudios realizando la pinealectomía. Tanto en periodos de luz como de oscuridad, la pinealectomía causa cambios en el período de actividad, así como cambios en la cantidad de actividad diaria. El cegamiento o tapado del ojo parietal también altera el período del ritmo de curso libre de la actividad. La administración continua de melatonina a través de cápsulas subcutáneas provoca un alargamiento significativo del período del ritmo de actividad en lagartos pinealectomizados y/o cegados, que muestran que la melatonina ejerce su acción en sitios extrapineales y extraoculares [Underwood, 1981].

Los resultados indican que el ojo parietal, y posiblemente los ojos, actúan como dispositivos de acoplamiento o como marcapasos circadianos dentro de un sistema multioscillador. La melatonina puede funcionar como un mensajero químico entre el ojo parietal y el resto del sistema circadiano. [Underwood, 1981].

A lo largo de la filogenia ha sufrido diversas modificaciones que han supuesto la transformación gradual de un sistema directamente fotosensible, a otro regulado indirectamente por la información fótica recibida de los ojos [Rol & Madrid, 2006].



**Ilustración 5.** Representación gráfica de la regulación fotoperiódica de las células pineales en diferentes especies. (A) Peces, reptiles y anfibios; (B) Aves; (C) Mamíferos [Hernández, 1992].

El tipo celular principal de la glándula pineal lo constituyen los pinealocitos, células que pueden pertenecer a tres categorías: verdaderos fotorreceptores pineales, fotorreceptores pineales modificados y pinealocitos en sentido estricto. A medida que se avanza en la escala filogenética los fotorreceptores pineales, similares a los conos y bastones de la retina, dieron paso a los pinealocitos verdaderos que constituyen una célula neuroendocrina típica de mamíferos. A pesar de las grandes diferencias existentes entre los diferentes tipos celulares todos ellos son capaces de sintetizar melatonina. No obstante, la coexistencia de fotorreceptores, fotorreceptores modificados y pinealocitos en un ciclóstomo como la lamprea, indica que todos estos tipos celulares pudieron evolucionar en paralelo [Rol & Madrid, 2006].

En mamíferos, la glándula pineal ha perdido la capacidad de detectar la luz directamente, pero todavía responde a la luz y a la oscuridad gracias a que recibe una compleja y tortuosa conexión neuronal desde los ojos [Rol & Madrid, 2006].

En el caso de peces, anfibios y algunos reptiles la luz actúa directamente sobre fotorreceptores pineales, induciendo hiperpolarización e inhibición del marcapasos intrapineal. Durante la noche, al desaparecer la señal inhibitoria, aumenta la actividad del enzima N-acetiltransferasa (NAT) y, consecuentemente, la síntesis y secreción de melatonina [Hernández, 1992].

En aves la luz inhibe la actividad NAT directamente al actuar sobre el marcapasos intrapineal, e indirectamente al actuar a través de la retina sobre el núcleo supraquiasmático (NSQ). Esta vía induce la liberación de noradrenalina (NA) y la producción de AMPc en la célula pineal, lo que causa inhibición de la actividad NAT. Durante la noche, la desaparición de las influencias inhibitorias permite el incremento de la actividad NAT y la producción de melatonina [Hernández, 1992].

### **1.5. Sistema circadiano en vertebrados no mamíferos**

Estos grupos poseen múltiples entradas fotorreceptoras al sistema, incluyendo la retina, la pineal y, en algunos casos, fotorreceptores profundos encefálicos. Podría decirse que en estos grupos comienza a verse una tendencia a la internalización de las estructuras circadianas, que en muchos invertebrados se encuentran en zonas más periféricas y, por ende, más expuestas a diversos riesgos. El sistema circadiano en estos animales es multioscilario, en general compuesto por los ojos, la glándula pineal y zonas hipotalámicas que serían homólogas a los núcleos supraquiasmáticos [Underwood et al, 1977]. Estas estructuras forman lo que Michael Menaker, uno de los principales cronobiólogos en actividad, llama “el eje circadiano” (y que, bajo ciertas condiciones experimentales, también se comprueba en mamíferos), que se ha mantenido a lo largo de la historia evolutiva de los vertebrados. Los reptiles Anolis e Iguana han sido extensamente estudiados en cuanto a la generación y sincronización de ritmos circadianos. En Anolis la pinealectomía produce una arritmia total de la actividad locomotora, acompañada frecuentemente por el fenómeno de desincronización interna. En algunas especies de reptiles, la pinealectomía, sin llegar a suprimir la actividad circadiana, modifica la curva de respuesta de fase

a la luz. En los reptiles, la pineal constituye una estructura fotorreceptora complementaria a la de los ojos laterales. Esta capacidad se verifica principalmente en anuros. La iguana posee osciladores no sólo en la pineal sino en el órgano parietal y ojos laterales, que controlan ritmos diferentes. Los reptiles presentan ritmos diarios y circadianos [Tosini y Menaker, 1998].

Además de la función de la retina y de la pineal como osciladores jerarquizados, se identifican en ciertos peces, anfibios y en reptiles, un conjunto de neuronas hipotalámicas osciladoras, que pueden considerarse como precursoras de las neuronas supraquiasmáticas de mamíferos. Este hecho es notable en lagartijas.

Después de la pinealectomía de los lacértidos de la especie *Gallotia galloti*, mantenidos en condiciones constantes de oscuridad, la mayoría no mostraron un ritmo circadiano significativo, y su actividad locomotora se difundió durante todo el período de 24 h. Por lo tanto, la glándula pineal parece jugar un papel importante como un marcapasos principal que regula el ritmo de actividad endógena en condiciones constantes [Molina-Borja, M., 1996]. Este resultado contrasta con el encontrado en la especie *Podarcis sicula*, donde después de la pinealectomía solo se encontraron cambios en la duración del período de free running.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El ritmo actividad-inactividad de los reptiles depende del ritmo de luz-oscuridad externo. Estos animales ajustan su actividad de acuerdo con las circunstancias ambientales más favorables, lo que representa una ventaja adaptativa. En esta regulación, el complejo pineal realiza un papel primordial ya que sin él los organismos no son capaces de presentar ciclos circadianos constantes.

En trabajos anteriores sobre reptiles, en especial el realizado por Molina-Borja, M. en 1996 sobre el lacértido *Gallotia galloti*, se ha confirmado que la pinealectomía produce una arritmia de la actividad locomotora en estos animales. Este hecho sugiere que la glándula pineal tiene un papel importante como marcapasos principal que regula el ritmo de actividad endógena en estos animales.

La hipótesis de este estudio se basa en el efecto de que al cubrir el ojo parietal, se bloquearía la llegada de la estimulación lumínica ambiental a la glándula pineal, lo que provocaría un desajuste pronunciado en el ritmo actividad-inactividad. En el caso de que no se produzca esta desincronización tan pronunciada, habrá que considerar que hay otra u otras vías que sincronizan el ritmo actividad-inactividad en esta especie.

El objetivo principal de este trabajo es comprobar, sin proceder a una pinealectomía, la función del órgano pineal en la regulación del ritmo circadiano del lacértido *Gallotia galloti*. Para ello, se compararán los ritmos de actividad motora del lacértido con el ojo parietal tapado y sin tapar en varias condiciones de luz-oscuridad.

Tal como se ha comentado antes, una de las principales propiedades de los ritmos biológicos es que persisten bajo condiciones ambientales constantes (pero entran en curso libre o free running), es decir, tienen un carácter endógeno.

Por eso y como objetivos específicos, se comprobará:

- si un ritmo luz-oscuridad produce ajustes en la actividad motora del lacértido *Gallotia galloti*.
- si el reptil *Gallotia galloti* presenta un ritmo endógeno cuando permanece bajo condiciones ambientales constantes.
- la capacidad del lacértido en reordenar su ritmo después de sufrir una desincronización.
- la importancia del órgano pineal en la regulación del ciclo actividad-inactividad en esta especie.

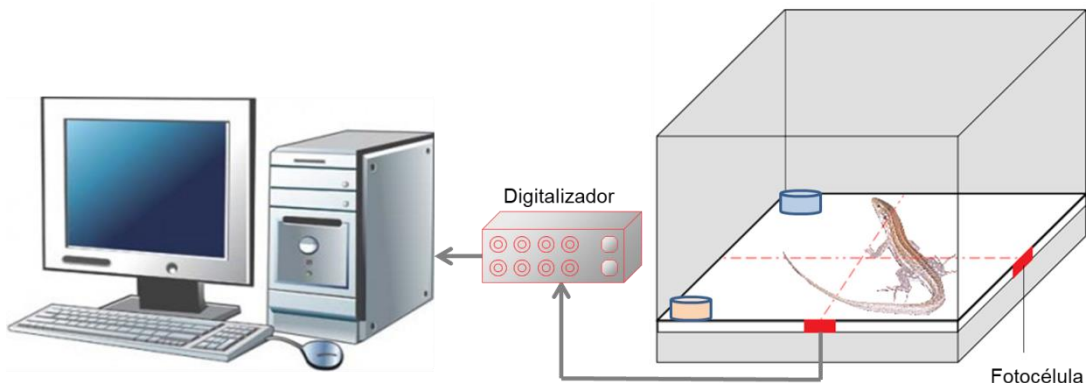
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Animales.

En este estudio se han utilizado 11 individuos de la especie *Gallotia galloti* de la familia Lacértida, concedidos por el Gobierno Autónomo Canario y transportados hacía la UIB para su mantenimiento en el estabulario de la universidad.

En el laboratorio, cada lagarto fue introducido en una jaula de 23 cm x 21 cm provista con gravilla previamente lavada y dos placas de Petri en las que se colocaron comida y agua. La parte superior de la jaula se cubrió con una malla de mosquitera fijada con gomas elásticas para evitar que los animales puedan escapar. Estos sensores están instalados en marcos colocados en el perímetro de la jaula como se muestra en la **ilustración 6**.

Las condiciones iniciales del hábitat fueron de 12 horas de luz y 10 horas de oscuridad, con una temperatura constante de 27°C y entre un 60-70% de humedad. En cuanto al alimento, se les suministró una dieta de papilla de fruta, verdura y carne, además de agua.



**Ilustración 6.** Representación de una jaula individual con el sensor fotocelular y el digitalizador que transmite la información al ordenador.

#### 3.2. Metodología

Los movimientos realizados por los lagartos fueron registrados durante periodos de 10 días en los que se muestrearon intervalos de 5 minutos, y se detectaron los movimientos con un intervalo mínimo de 10 milisegundos por movimiento. Los sensores detectan mediante haces de luz los movimientos de los animales. 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 experimento consistió en registrar el ritmo circadiano de los lagartos en 3 ciclos diferentes de 10 días cada uno.

Los ciclos de luz-oscuridad en cada parte del proyecto son los siguientes:

1. Un primer ciclo consistió en 12 horas de luz y oscuridad en el cual la luz permaneció encendida desde las 8:00 am hasta las 20:00 pm, mientras que la oscuridad se mantuvo desde las 20:00 pm hasta las 8:00 am. (LO1).
2. En el segundo ciclo se mantuvieron 24h de luz constante (LL).
3. En el tercer ciclo se volvió a las condiciones del primer ciclo, es decir, 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (LO2).



**Ilustración 7.** Fotografía de un individuo de *Gallotia galloti* cuyo ojo parietal ha sido cubierto con un retal.

La segunda parte del experimento consistió en realizar el mismo procedimiento, pero esta vez tapando el órgano parietal del animal. Para ello, primero se eliminó la piel muerta de la zona superior de la cabeza con ayuda de un bisturí, después se limpió dicha zona eliminando cualquier resto de piel muerta con ayuda de una gasa mojada en agua. Posteriormente, mediante el manejo de pinzas se colocó un pequeño trozo de tela opaca fijada con un pegamento sobre la cabeza del lagarto tapando el ojo parietal, tal como se puede observar en la siguiente fotografía (**Ilustración 7**).

### 3.3 Análisis de los datos.

El análisis de los datos rítmicos requiere su propia metodología que difiere de la estadística convencional. Para este propósito se utilizan fundamentalmente dos procedimientos: uno basado en el ajuste a una función sinusoidal, (el método de cosinor) y en otro en base a un análisis no paramétrico [Madrid & Rol, 2015].

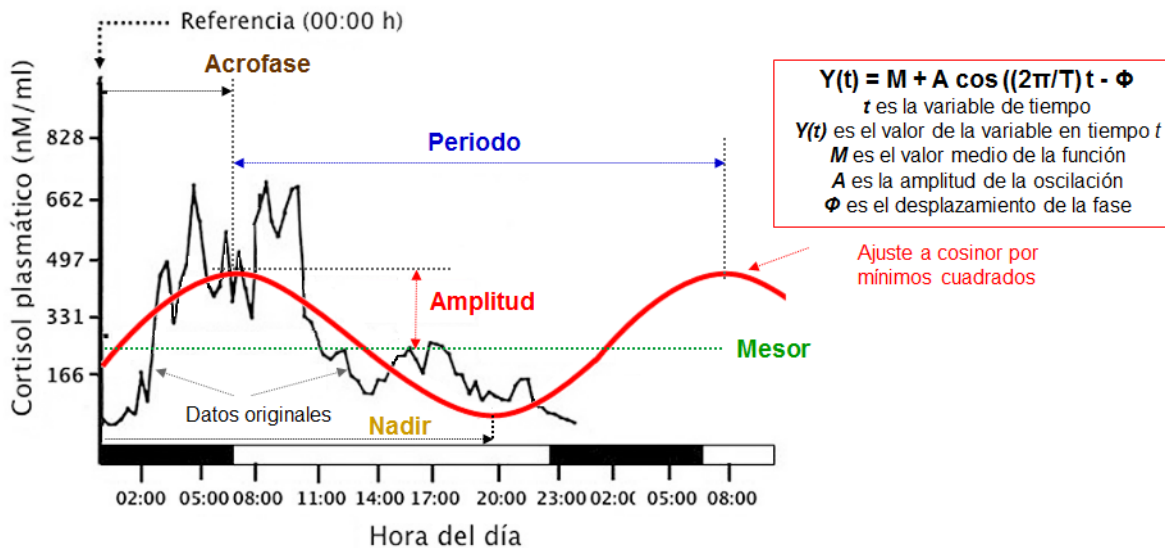


Ilustración 8. Ajuste de una función coseno a los datos originales

El análisis de Cosinor es un procedimiento matemático que se basa en el ajuste por mínimos cuadrados de los datos originales a una función coseno. Los principales parámetros que se definen son: MESOR (Midline Estimating Statistic of Rhythm), amplitud y acrofase. Puesto que se puede aplicar a datos no equidistantes, el Mesor, o valor medio del ritmo ajustado a la senoide, no siempre coincide con la media aritmética de los datos. La amplitud es la diferencia entre el Mesor y el valor máximo o mínimo de la función coseno. La acrofase se corresponde con el momento en el que se produce el valor máximo de la función. Puesto que el ritmo de actividad descanso en humanos presenta una distribución asimétrica en las 24 horas del día (aproximadamente 8 de descanso frente a 16 horas de actividad) y su forma se asemeja más a una onda cuadrada que a un senoide, el método cosinor sólo proporciona una descripción general y un tanto somera del ritmo. No obstante, es un método relativamente fiable que permite obtener más que suficiente información cuantitativa del ritmo (**Ilustración 8**).

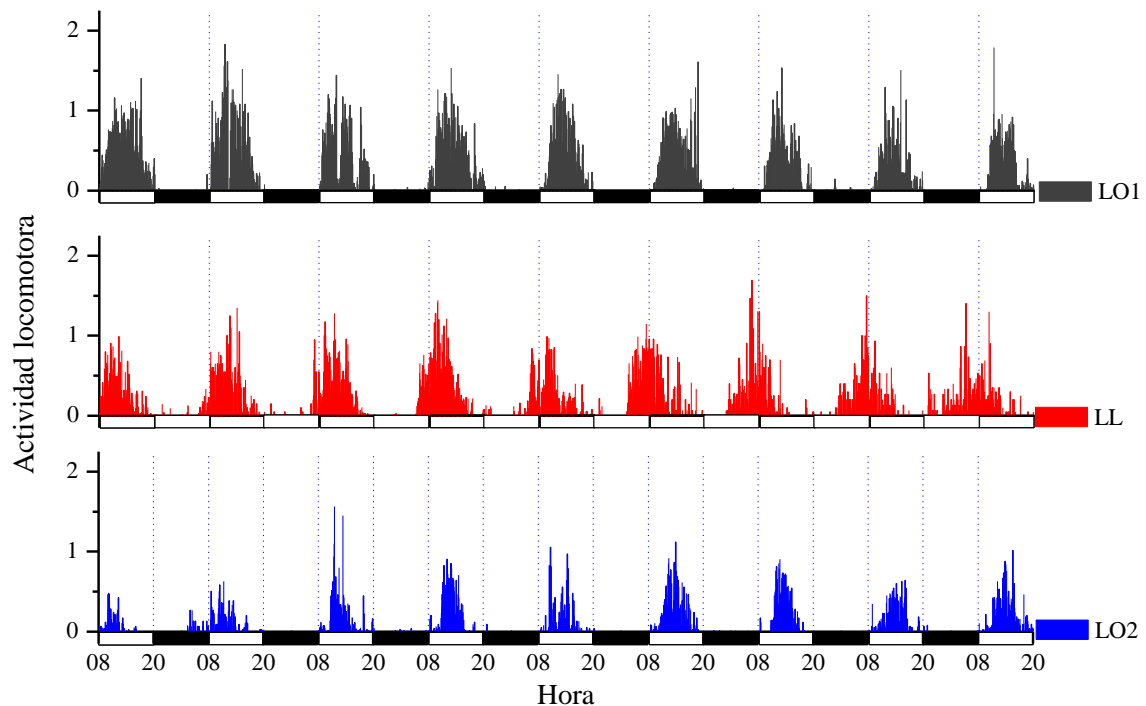
Posteriormente, se realizó un análisis estadístico de los valores de los parámetros obtenidos mediante el método del Cosinor (el mesor, la amplitud y la acrofase). Para ello, se aplicó la prueba t-test para medias de muestras emparejadas del programa **OriginPro**.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 ACTOGRAMAS.

#### *Ojo parietal intacto.*

Mediante el programa **OriginPro** se elaboraron 4 gráficas correspondientes a los diferentes ciclos de experimentación; Luz-Oscuridad (LO1 y LO2), Luz-luz (LL). En cada una de las gráficas se ha representado la actividad de los animales durante los 9 días del ciclo. Las franjas blancas hacen referencia a las horas de luz (entre las 8:00h y las 20:00h) mientras que las franjas negras hacen referencia a las horas de oscuridad (desde las 20:00h hasta las 8:00h). **Gráfica 1.**



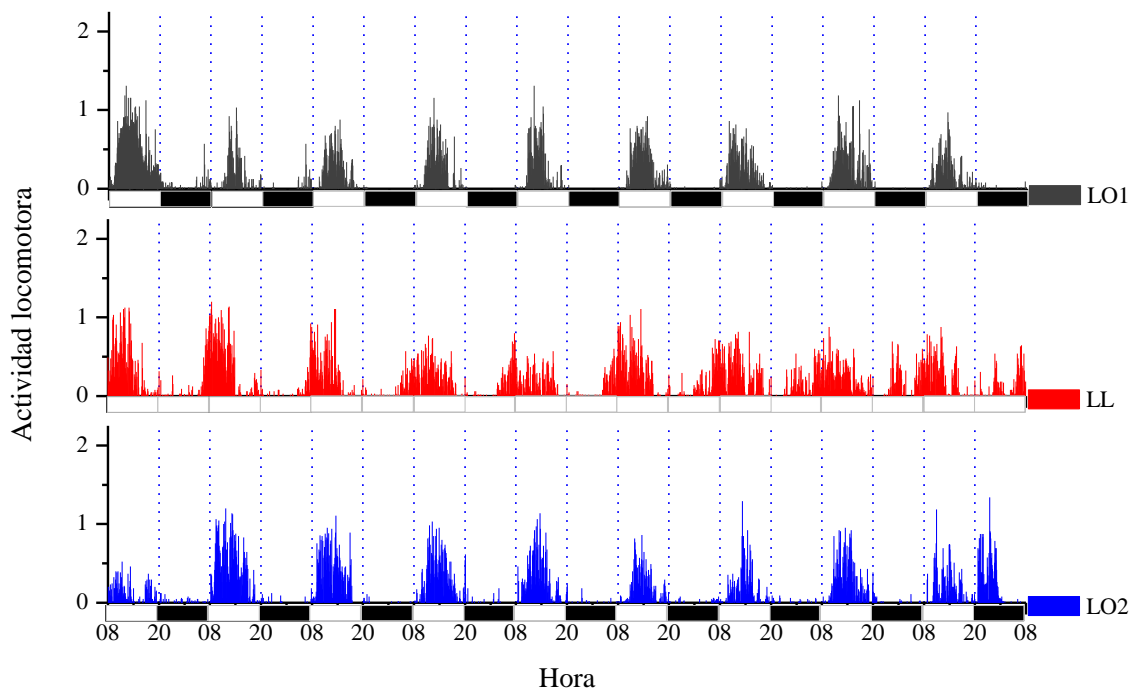
**Gráfica 1.** Actividad locomotora de *Gallotia galloti* en diferentes condiciones de luz-oscuridad. Arriba: LO1: Consta de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. LL: Consta de 24 horas de luz constante. LO2: Se retoman las 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad iniciales.

Se puede observar como en el periodo luz-Oscuridad, la actividad motora de los animales se da durante las horas de luz, mientras que en las horas de oscuridad la actividad motora se ve disminuida drásticamente. Este ritmo de actividad se mantiene con regularidad durante los diferentes días de la semana. En el periodo de experimentación en la que se dispuso luz continua (LL) se puede apreciar como la actividad de los animales comienza durante la noche subjetiva, por lo que podemos suponer que los animales sufren progresivamente un adelanto de fase que empieza a ser notorio una vez alcanzado el quinto día del ciclo. En el tercer periodo de

experimentación las condiciones de luz y oscuridad fueron restablecidas (LO2), en este ciclo la actividad motora vuelve a darse durante las horas de luz, es decir, el ritmo endógeno del animal se ha reorganizado después de sufrir una desincronización causada por el ciclo anterior.

### Ojo parietal tapado.

En la segunda parte del trabajo experimental los individuos presentaban el ojo parietal tapado, por lo que, la vía de señalización lumínica entre las células fotosensibles del ojo parietal y la glándula pineal se encuentra inhibida. Por tanto, cabría esperar que el ritmo endógeno sufriera desincronizaciones a lo largo de los diferentes ciclos. Por el contrario, los resultados obtenidos muestran que los animales son capaces de mantener un ritmo endógeno, como es el caso del ciclo Luz-Oscuridad (LO), en el que la actividad locomotora se concentra principalmente durante las horas de luz de forma periódica. En el ciclo Luz-luz (LL), se puede observar un adelanto de fase, al igual que con el ojo parietal descubierto. **Gráfica 2.**

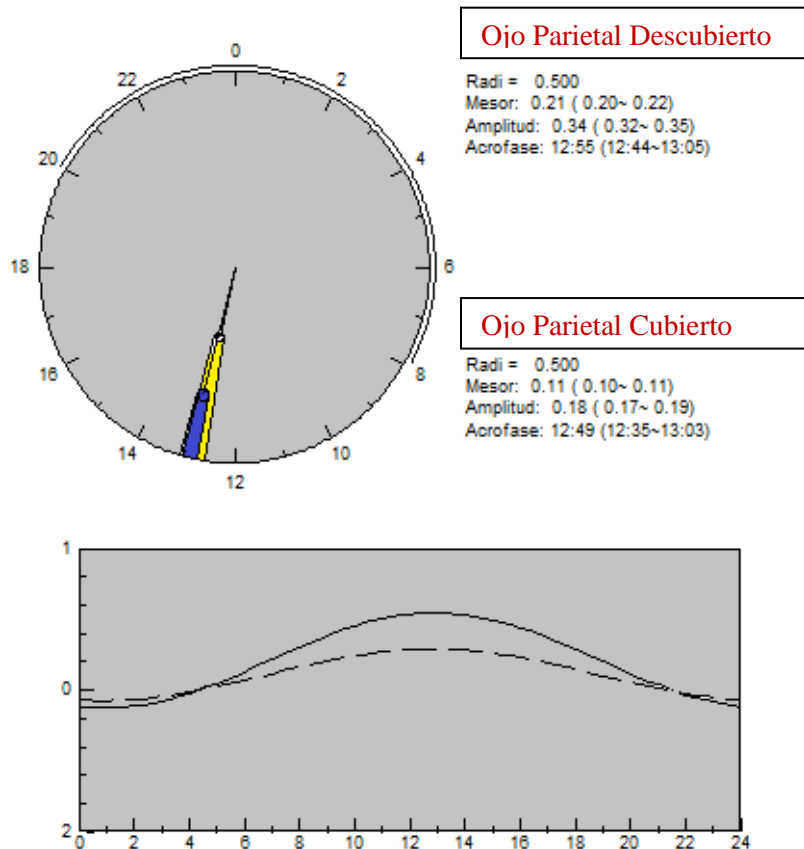


**Gráfica 2.** Actividad locomotora de *Gallotia galloti* con el ojo parietal tapado durante las diferentes condiciones de luz-oscuridad. Arriba: LO1: Consta de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. LL: Consta de 24 horas de luz constante. LO2: Se retoman las 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad iniciales.

## 4.2 MÉTODO DEL COSINOR.

Ya que la variación rítmica de la actividad se ajusta a una curva sinusoidal, se utilizó el método del Cosinor. Consiste en el ajuste de una función coseno a los datos originales. A partir de la función se determina el mesor o media del ritmo, la amplitud o diferencia entre el máximo o mínimo valor de la función y el mesor, y la acrofase, o localización en la escala de tiempo del máximo valor de la función.

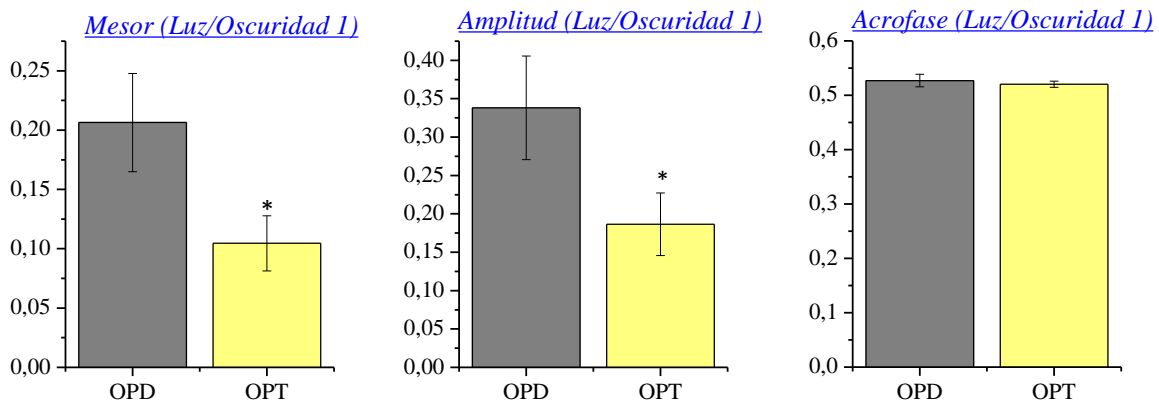
### A- Luz-Oscuridad 1.



**Gráfica 3.** Comparación de los valores del mesor, amplitud y acrofase de los ritmos endógenos durante el periodo luz-oscuridad. Arriba: Ojo parietal descubierto (línea continua). Abajo: Ojo parietal tapado (línea discontinua).

Los lagartos que presentaban el ojo parietal descubierto presentan una mesor mayor, con un valor de 0.21 que el mesor de los animales que presentaban el ojo parietal descubierto, con un 0.11. Lo mismo sucede con la amplitud, que presenta un valor mayor en la primera parte experimental, con un valor de 0.34, mientras que en la segunda fase se obtuvo un valor de 0,18. Esto indica que la actividad motora es mayor en la primera parte experimental (ojo parietal descubierto) que en la segunda (Ojo parietal Tapado). Por otro lado, las acrofasas se sitúan sobre las 12:50 pm. (**Gráfica 3**).

El análisis estadístico t-test ha verificado que existen diferencias significativas entre el mesor y la amplitud de ambas partes experimentales, por el contrario, no hay diferencias significativas entre las acrofases. (**Tabla 1 y Gráfica 4**).



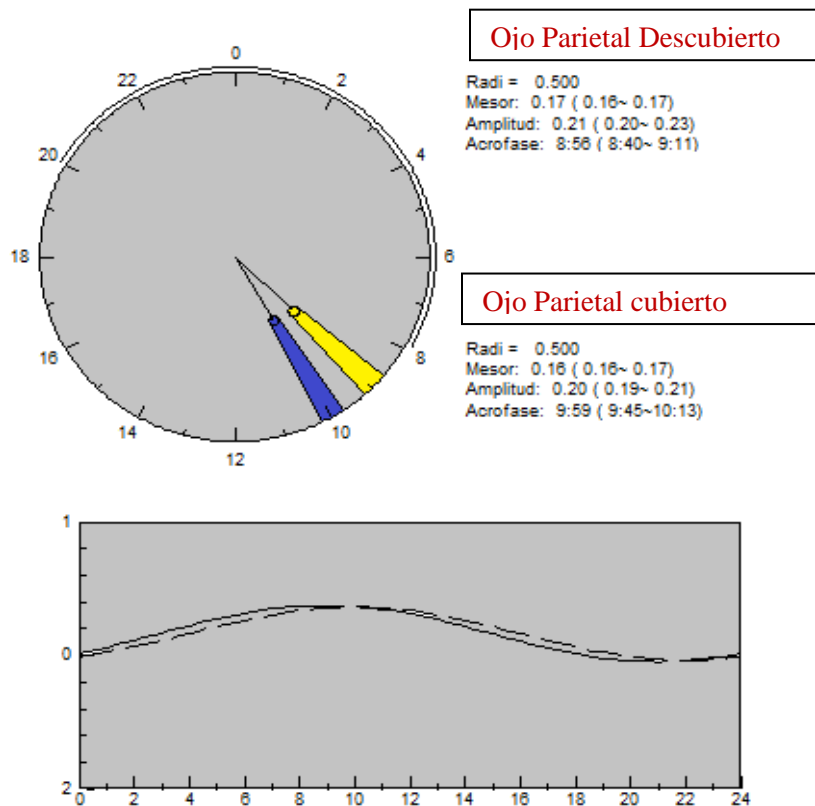
**Gráfica 4.** Representación gráfica de los valores de mesor, amplitud y acrofase durante el ciclo Luz-Oscuridad 1. OPD: Ojo parietal Descubierta. OPT: Ojo Parietal tapado.

Luz-Oscuridad	N	Mean	SD	SEM	t Statistic	DF	Prob> t
Mesor (Ojo Parietal Destapado)	11	0,20636	0,13735	0,04141	2,66501	10	0,02369
Mesor (Ojo Parietal Cubierto)	11	0,10455	0,07699	0,02321			
Amplitud (Ojo Parietal Destapado)	11	0,33818	0,224	0,06754	2,68699	10	0,02282
Amplitud (Ojo Parietal Cubierto)	11	0,18636	0,1353	0,04079			
Acrofase (Ojo Parietal Destapado)	11	2,42E+06	0,0386	0,01164	0,36191	10	0,72495
Acrofase (Ojo Parietal Cubierto)	11	2,42E+06	0,019	0,00573			

**Tabla 1.** Tabla comparativa de los valores estadísticos obtenidos mediante el análisis t-test en el periodo luz oscuridad. El círculo marca los parámetros estadísticamente significativos. N: número de muestras. Mean: Mediana. SD: Desviación estándar. SEM: Error típico. t-Statistic: Valor del estadístico. DF: Grados de libertad (n-1). Prob>|t|: p-valor.

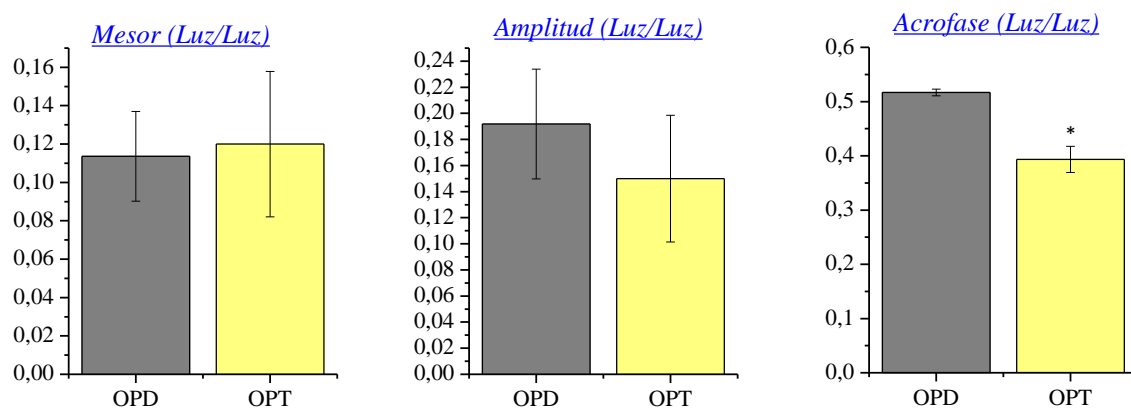
### B- Luz-Luz

Si les aplicamos luz constante durante 24 horas podemos ver que el mesor obtiene un valor de 0.17, la amplitud un valor de 0.21 y que la acrofase se sitúa a las 8:56 de la mañana. Mientras que con el ojo parietal tapado podemos ver que el mesor obtiene un valor de 0.176 la amplitud un valor de 0.20 y que la acrofase se sitúa a las 9:59 de la mañana. **Gráfica 5.**



**Gráfica 5.** Comparación de los valores del mesor, la amplitud y la acrofase de los ritmos endógenos durante el periodo luz-Luz. Arriba: Ojo parietal descubierto (línea continua). Abajo: Ojo parietal tapado (línea discontinua).

El análisis estadístico t-test ha verificado que en este caso no existen diferencias significativas entre el mesor y la amplitud de ambas partes experimentales, por el contrario, hay diferencias significativas entre las acrofases. **(Tabla 2 y Gráfica 6).**



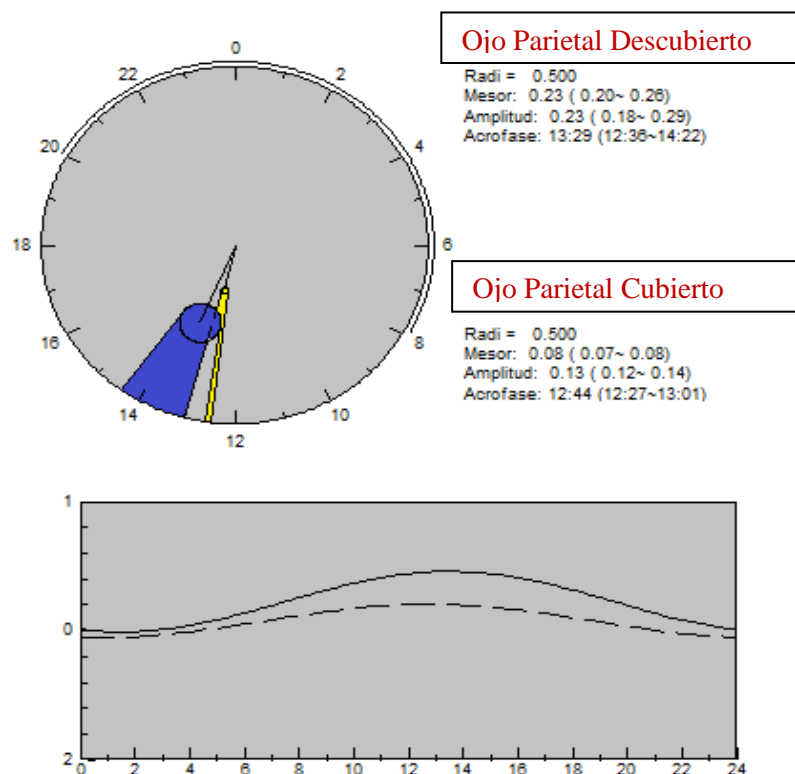
**Gráfica 6.** Representación estadística de los valores de mesor, amplitud y acrofase durante el ciclo Luz-Luz. OPD: Ojo parietal Descubierto. OPT: Ojo Parietal tapado.

Luz-Luz	N	Mean	SD	SEM	t Statistic	DF	Prob> t
Mesor (Ojo Parietal Destapado)	11	0,11364	0,07749	0,02337	-0,14332	10	0,88888
Mesor (Ojo Parietal Cubierto)	11	0,12	0,1257	0,0379			
Amplitud (Ojo Parietal Destapado)	11	0,19182	0,1397	0,04212	0,6364	10	0,53881
Amplitud (Ojo Parietal Cubierto)	11	0,15	0,16081	0,04849			
Acrofase (Ojo Parietal Destapado)	11	2,42E+06	0,02063	0,00622	4,89516	10	6,28E-04
Acrofase (Ojo Parietal Cubierto)	11	2,42E+06	0,08058	0,0243			

**Tabla 2.** Tabla comparativa de los valores estadísticos obtenidos mediante el análisis t-test en el periodo luz-luz. N: número de muestras. El círculo marca los parámetros estadísticamente significativos. Mean: Mediana. SD: Desviación estándar. SEM: Error típico. t-Statistic: Valor del estadístico. DF: Grados de libertad (n-1). Prob>|t|: p-valor.

### C- Luz-Oscuridad 2

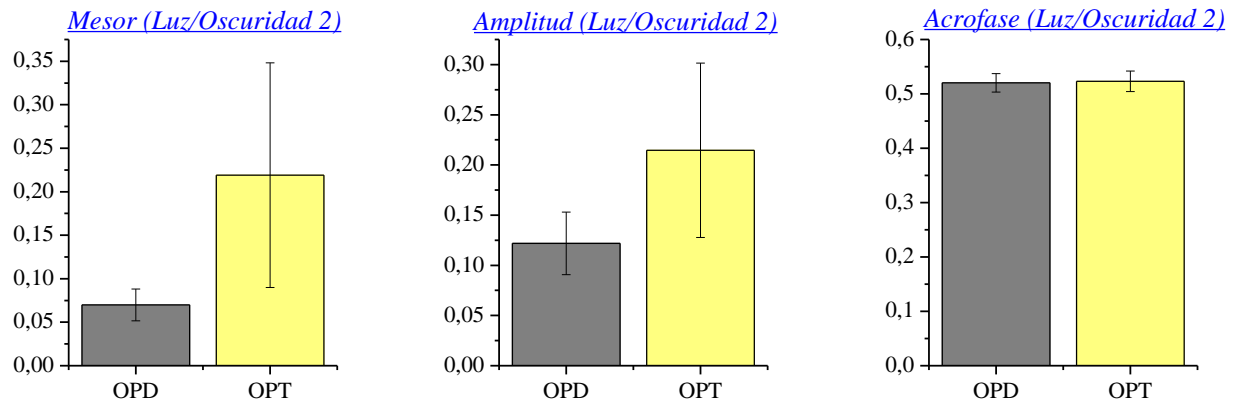
Los valores del segundo ciclo luz-oscuridad son; para el mesor un 0.23, para la amplitud un 0.23 y la acrofase se sitúa a las 13:29. Mientras que con el ojo parietal cubierto obtienen un valor de 0.08 mesor, para la amplitud un 0.13 y la acrofase se sitúa a las 12:44. (**Gráfica 7.**)



**Gráfica 7.** Comparación de los valores del mesor, la amplitud y la acrofase de los ritmos endógenos durante el segundo periodo luz-Oscuridad. Arriba: Ojo parietal descubierta (línea continua). Abajo: Ojo parietal tapado (línea discontinua).



El análisis estadístico t-test ha verificado que no existen diferencias significativas entre el mesor y la amplitud de ambas partes experimentales, en este caso, tampoco hay diferencias significativas entre las acrofases. (Tabla 3 y Gráfica 8).



**Gráfica 8.** Representación estadística de los valores de mesor, amplitud y acrofase durante el ciclo Luz-Luz. OPD: Ojo parietal Descubierta. OPT: Ojo Parietal tapado

Luz-Oscuridad 2.	N	Mean	SD	SEM	t Statistic	DF	Prob> t
Mesor (Ojo Parietal Destapado)	11	0,07	0,06066	0,01829	-1,16931	10	0,2694
Mesor (Ojo Parietal Cubierto)	11	0,21909	0,4284	0,12917			
Amplitud (Ojo Parietal Destapado)	11	0,12182	0,10333	0,03115	-1,09737	10	0,2982
Amplitud (Ojo Parietal Cubierto)	11	0,21455	0,28811	0,08687			
Acrofase (Ojo Parietal Destapado)	11	2,42E+06	0,05642	0,01701	-0,26757	10	7,94E-01
Acrofase (Ojo Parietal Cubierto)	11	2,42E+06	0,06244	0,01883			

**Tabla 2.** Tabla comparativa de los valores estadísticos obtenidos mediante el análisis t-test en el segundo ciclo de luz-oscuridad. N: número de muestras. Mean: Mediana. SD: Desviación estándar. SEM: Error típico. t-Statistic: Valor del estadístico. DF: Grados de libertad (n-1). Prob>|t|: p-valor.

## 5. DISCUSIÓN

En estudios realizados en reptiles como *Anolis* e *Iguana* se ha comprobado la importancia de la glándula pineal mediante la pinealectomía, que consiste en la extirpación de la glándula pineal. En *Anolis carolinensis* la pinealectomía produce una arritmia total de la actividad motora y una fuerte desincronización de los ritmos circadianos del animal. Se hipotetizó que la glándula pineal tenía un papel principal en la regulación de los ritmos endógenos.

En el estudio de [Molina-Borja, M., 1996] después de la pinealectomía de los lacértidos de la especie *Gallotia galloti*, mantenidos en condiciones constantes de oscuridad, la mayoría no mostraron un ritmo circadiano significativo, y su actividad locomotora se difundió durante todo el período de 24 h.

Este resultado contrasta con el encontrado en la especie *Sceloporus occidentalis*, donde después de la pinealectomía solo se encontraron cambios en la duración del período de free running. Por lo que las diferentes respuestas a la pinealectomía pueden deberse a variaciones interespecíficas debidas al grado de adaptación de las diferentes especies a nichos particulares. [Underwood, 1983].

En los resultados obtenidos en nuestro estudio la glándula pineal no ha sido extirpada, sino que solo se ha inhibido la recepción de la información lumínica por parte del ojo parietal. Los resultados indican que los animales son capaces de mantener un ritmo endógeno con el ojo parietal tapado, lo que sugiere que la glándula pineal presenta otras vías de señalización, aparte del ojo parietal, que le permiten mantener el ritmo endógeno durante los diferentes ciclos de luz-oscuridad.

En contraposición, los resultados obtenidos en otros estudios como en el de [Underwood 1981] demuestran que el cegamiento del ojo parietal altera el período del ritmo de curso libre de la actividad. Mientras que la administración continua de melatonina a través de cápsulas subcutáneas provoca un alargamiento significativo del período del ritmo de actividad en lagartos pinealectomizados.

Cabe destacar que la pinealectomía dio resultados diferentes en las distintas especies de reptiles, como es en el caso de *Sceloporus occidentalis*, estas diferencias pueden ser debidas a las variaciones morfológicas en el ojo parietal de los lagartos, ya que su tamaño, así como exposición a la luz, varía según las diferentes especies de reptiles, siendo de mayor tamaño en Iguanas.

Por lo que, podríamos suponer que en el caso de *Gallotia galloti* existen otras vías de señalización que permiten informar al NSQ y a la glándula pineal sobre la recepción lumínica permitiendo así la regulación del ritmo. Así, una pérdida o una alteración en una de estas vías puede no producir cambios funcionales importantes. Este es el caso de los mamíferos en los que se ha demostrado que la glándula pineal recibe información lumínica mediante vías complejas que la conectan con los receptores fotosensibles de los ojos. Mientras que, en caso de las aves, la señalización lumínica hacia la glándula pineal se da mediante los receptores de la retina y los receptores de la glándula pineal, que sí que es capaz de recibir información directamente a diferencia de los mamíferos. [Hernández, 1992].

## 6. CONCLUSIONES.

Se ha registrado la actividad locomotora del reptil *Gallotia galloti* en diversas condiciones de luz-oscuridad. Los animales fueron estudiados tanto con el ojo pineal destapado como tapado.

Del estudio se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. El ritmo luz-oscuridad, principal Zeitgeber, produce ajustes en la actividad motora del lacértido *Gallotia galloti*, con un acrofase entre 12:44 y 13:05.
2. Estos animales son capaces de mantener un ritmo endógeno en condiciones de luz constantes, presentando un adelanto de fase y son capaces de resincronizar su ritmo endógeno al volver el ritmo luz-oscuridad exógeno.
3. El tapar el ojo parietal no causó efecto significativo sobre el ritmo locomotor de *Gallotia galloti*, probablemente porque en estos reptiles el tercer ojo constituye una estructura fotorreceptora complementaria a la de los ojos laterales.
4. Además de la función de la retina y de la pineal como osciladores jerarquizados, se identificaron en ciertos peces, anfibios y en reptiles, un conjunto de neuronas hipotalámicas osciladoras, que pueden considerarse como precursoras de las neuronas supraquiasmáticas de mamíferos. Este hecho es notable en lagartijas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. Aschoff, J. (1967). Adaptive cycles: their significance for defining environmental hazards. *Int. J. Biometeorol*, 11(4), 255-278.
3. Aschoff, J. (1979). Circadian Rhythms: Influences of Internal and External Factors on the Period Measured in Constant Conditions. *Tierpsychol*, 49, 225-249.
4. Aschoff, J. (1964). Circadian rhythms in man. *Science*, 148, 1427-143.
5. Benarroch, E. E. (2008). Suprachiasmatic nucleus and melatonin. *Neurology*, 71(8), 594-598. (<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000324283.57261.37>).
6. Carpentieri A. R., Oliva C., Díez-Noguera A., & Cambras T. (2015). Melatonin administration modifies circadian motor activity under constant light depending on the lighting conditions during suckling. *Chronobiol Int*, 32(7),994-1004.
7. Diego A., Golombek, Ruth E., & Rosenste. (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiological reviews*, 90, 1063-1102. <https://ehp.niehs.nih.gov/wp-content/uploads/121/6/ehp.121-a199.pdf>.
8. Fernández J., Ramos, MJ., & Vela A. (2010). Insomnio crónico: subtipos basados en hallazgos polisomnográficos, psicopatológicos y neuropsicológicos [tesis doctoral]. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid. Recuperado a partir de: <http://eprints.ucm.es/11415/>.
9. Gooley, J. J., Lu, J., Fischer, D. & Saper, C. B. (2003). A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *J. Neurosci*, 23, 7093–7106.
10. Guadarrama-Ortiz, P., Ramírez-Aguilar, R., et al. (2014). Controladores del Tiempo y el Envejecimiento: Núcleo Supraquiasmático y Glándula Pineal. *Int. J. Morphol.*, 32(2), 409-414.
11. Guerrero JM, Carrillo-Vico A., & Lardone PJ. (2007). La melatonina. *Investig Cienc*.
12. Halberg, F., M. B. Visscher., & Bittner. J. J. (1954). Relation of visual factors to eosinophil rhythm in mice. *Am. J. Physiol*, 179, 229-235.
13. Hernández, J. (1992). Fisiología humana. McGraw-Hill Interamericana de España.
14. Johnson, R. F., Moore, R. Y. & Morin, L. P. (1988). Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res*, 460, 297–313.
15. Kardong, K. V. (1998). Vertebrados: anatomía comparada, función, evolución (No. 596 KAR).
16. Lucas-Sánchez A., Martínez-Nicolás A., Escames G. & de Costa J. (2012). Envejecimiento del sistema circadiano. *Rev Esp Geriatr Gerontol*, 47(2), 76–80.
17. Madrid, J. A. & Rol, M. A. Ritmos, relojes y relojeros. Una introducción a la Cronobiología. *Revista Eubacteria. Especial de Cronobiología*, (1),1697-0071. Nº 33. 2015. ISSN

18. Mailloux A. 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.
19. Molina-Borja, M. (1996). Pineal Gland and Circadian Locomotor Activity Rhythm in the Lacertid *Gallotia galloti eisentrauti*: Pinealectomy Induces Arrhythmicity. *Biological Rhythm Research*, 1, 1-11.
20. Moore-Ede M. C., Sulzman F.M. & Fuller C.A. (1982). The Clock That Time Us. Physiology of the Circadian Timing System. *Harvard University Press*. Cambridge, Massachusetts, and London, England.
21. Moore-Ede, M. C., Sulzman, F. M., Fuller, C. A. (1982). The Clock that Times US. *Physiology of the Circadian System*. 448.
22. Reppert, S. M. & Weaver, D. R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418, 935-941.
23. Rol, M. A., & Madrid, J. A. (2006). Cronobiología básica y clínica. Editec@ Rec.
24. Saper, C. B., Scammell, T. E. & Lu, J. (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*. 437, 1257-1263.
25. Tosini G. & Menaker M. (1998). Multioscillatory circadian organization in a vertebrate, *Iguana iguana*. *J Neurosci*, 18(3),1105-1114.
26. 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.
27. Underwood, H. (1983). Circadian organization in the lizard *Anolis carolensis*: a multioscillator system. *J. Comp. Physiol. A* 152, 265-274.
28. Zug, G., Vitt, L., Vitt C. & Janalee (2002). Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles, Second Edition. San Diego: Academic Press. p. 75. 0-12-782622-X.