

Cronobiología y Experimentación Animal.

Departamento de Fisiología y Farmacología. Facultad de Biología. Universidad de Murcia.

La existencia de ritmos biológicos en las manifestaciones vitales es una característica fundamental de todo ser vivo. Ello supone que éste es un sistema bioquímico, funcional e incluso morfológico distinto según el momento del día en el que se estudie.

La aproximación clásica a la experimentación animal no tiene en cuenta, habitualmente, la existencia de ritmos biológicos en los sujetos sometidos a estudio. Esto puede implicar la aparición de importantes errores en la interpretación de los datos experimentales. Errores que se podrían evitar fácilmente mediante un mejor conocimiento de las propiedades de los ritmos biológicos y la toma en consideración de ciertos imperativos metodológicos.

En esta revisión expondremos algunas definiciones, resumiremos las propiedades principales de los ritmos biológicos, comentaremos cómo y dónde pueden aparecer estos ritmos y, finalmente, enunciaremos una serie de consideraciones metodológicas que ayudarán a integrar los ritmos biológicos en la experimentación biomédica.

INTRODUCCION

Si bien es cierto que la noción de ritmos biológicos es algo que forma parte de la experiencia común del hombre, baste recordar aquí los ciclos de sueño-vigilia, los ciclos menstruales o los que tienen lugar asociados a los cambios estacionales, el estudio objetivo de los ritmos es algo que se ha retrasado hasta la aparición de la Cronobiología en la última mitad del siglo XX. La Cronobiología surge así como una nueva disciplina biológica que, partiendo de un enfoque multidisciplinar, se propone el estudio de la organización temporal de los seres vivos, de sus mecanismos y de sus alteraciones.

La toma en consideración de la organización temporal de un ser vivo entraña que éste es un sistema bioquímico, funcional e incluso morfológico distinto según el momento del día en el que se estudie, y, además, supone que las diferentes variables que caracterizan la biología de un organismo muestran una definida relación entre ellas en lo que se refiere al momento en el que ocurren sus valores máximos y mínimos. La pérdida o alteración de esa coordinación entraña la aparición de trastornos funcionales en la vida del ser vivo.

Por tanto si, como está ampliamente demostrado, la organización temporal es una propiedad fundamental de los seres vivos eucariotas, cualquier tipo de experimentación biológica no podrá permanecer con una cierta credibilidad en el futuro si no es a condición de integrar, en los protocolos de estudio, elementos tomados de la Cronobiología, con independencia de que se trate de investigaciones de carácter básico o aplicado.

El objetivo que ha guiado esta revisión ha sido el de mostrar, junto con algunas definiciones y propiedades básicas de los ritmos biológicos, cómo afectan los fenómenos rítmicos a la experimentación animal.

PARAMETROS QUE DEFINEN UN RITMO

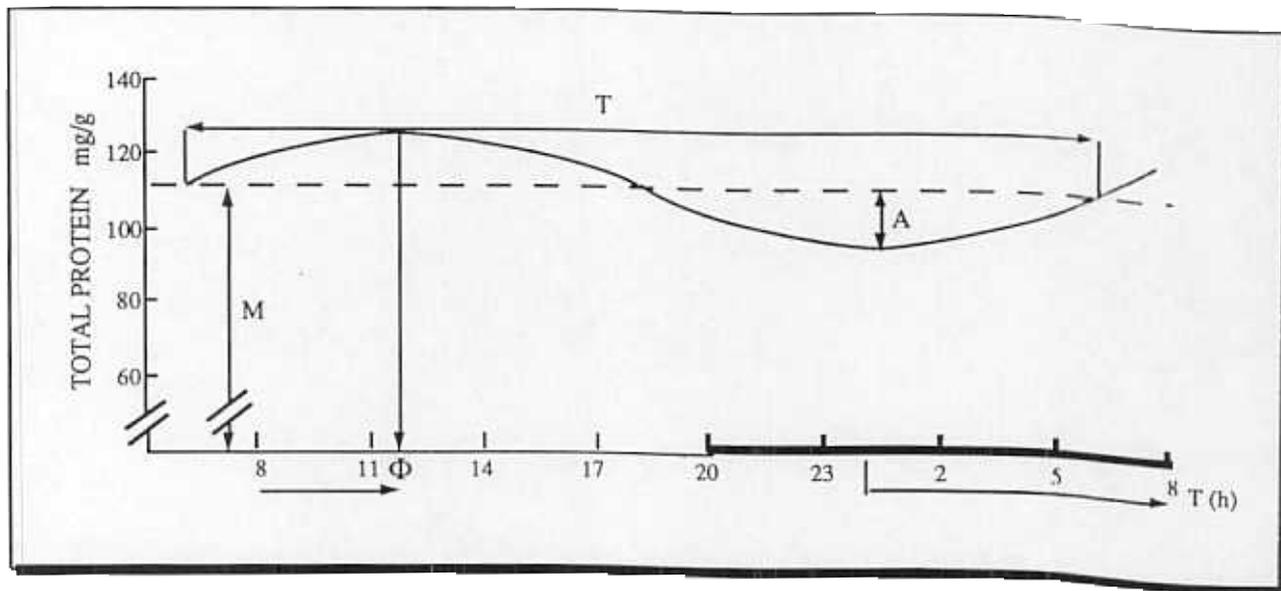
Por ritmo biológico podemos entender cualquier variación periódica y previsible de una variable de un organismo. Este carácter de cambio periódico ha sido determinante a la hora de utilizar funciones sinusoidales para intentar una aproximación objetiva al estudio de los ritmos. La descripción de un ritmo mediante una función sinusoidal (no siempre esto es posible) permite la caracterización de aquél y su cuantificación por la estimación de varios parámetros.

Los valores de proteína hepática de la rata constituyen un buen ejemplo que permitirá ilustrar mejor estos conceptos (Figura 1). Si determinamos la proteína hepática en ratas habituadas a vivir bajo un ciclo de LO (LO) de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (12:12), de tal modo que la única diferencia entre los diferentes lotes sea la hora del día en que se realiza el sacrificio, nos encontramos con que la media de los valores obtenidos cada 3 h dibuja en forma aproximada una función sinusoidal con un valor máximo al comienzo de la fase de oscuridad y un mínimo al inicio de la fase luminosa. El ajuste, mediante el procedimiento de los mínimos cuadrados, de una función del tipo $Y = M + A \cos(\omega t + f)$ permite el cálculo de cuatro parámetros que definen este ritmo: el periodo (t), la acrofase (f), la amplitud (A) y el nivel medio, denominado "mesor" (M).

El periodo es el intervalo de tiempo que media entre dos episodios (o accidentes) idénticos de la variación; en el ejemplo anterior el periodo es de 24 h. La acrofase es el tiempo que separa el máximo de la variación, del origen o fase de referencia; de nuevo volviendo al ejemplo, la acrofase se produce a las 12 h y 10 min (hemos tomado como referencia de fase la media noche). La batifase, término

Figura 1.

Parámetros que caracterizan el ritmo circadiano de la proteína hepática en la rata. Cada tres horas se ha representado la media \pm EEM de 6 animales. M=mesor, media ajustada del ritmo; A = amplitud, T=periodo; F = acrofase (Tomado de Soler y cols. 1988. Chronobiologia, 15: 205-212).



PROPIEDADES FUNDAMENTALES DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS

Las propiedades fundamentales de los ritmos biológicos son básicamente similares entre las diferentes categorías de ritmos, si bien algunos de estos ritmos pueden mostrar ciertas características propias.

Carácter Endógeno

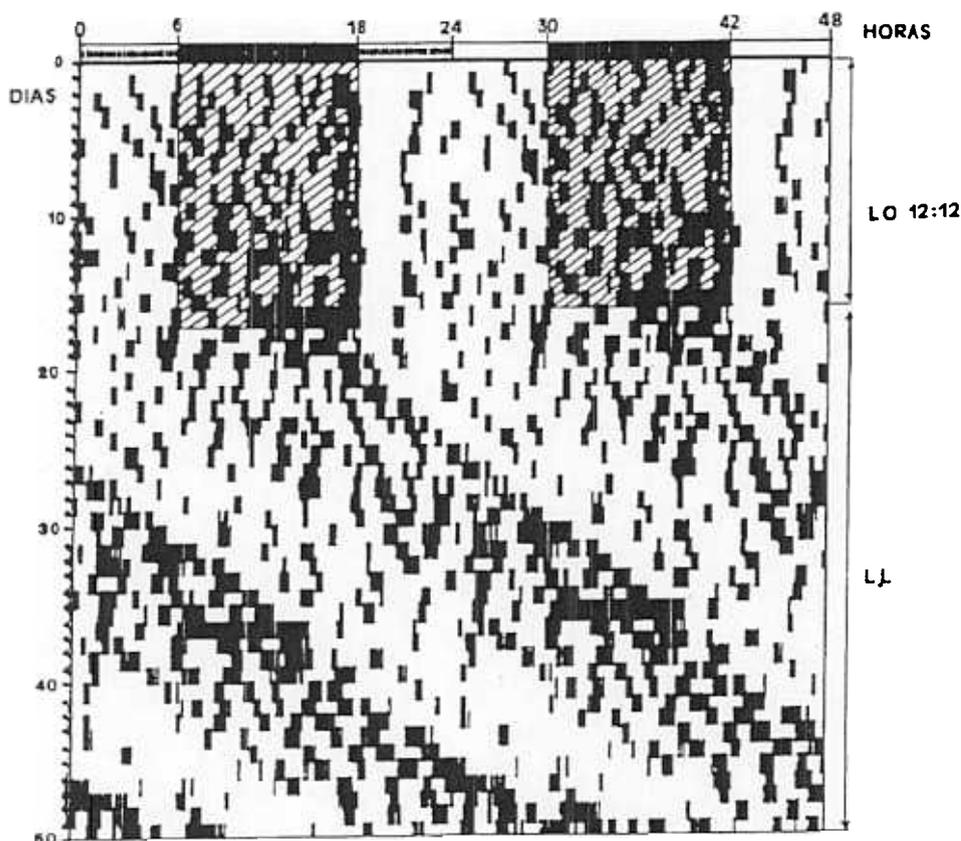
Quizás la primera propiedad que debemos comentar sea la de que los ritmos biológicos persisten en ausencia de señales externas que aporten información temporal. Ello permite diferenciar un verdadero ritmo biológico de cualquier otra oscilación forzada directamente por las condiciones ambientales. Rigurosos experimentos de aislamiento temporal, en los que el animal se mantiene bajo unas condiciones ambientales estrictamente constantes (luz u oscuridad continua, ausencia de ruidos, temperatura constante, etc.), han puesto de manifiesto que los ritmos biológicos se mantienen, aunque eso sí, su periodo se desvía ligeramente de las 24 h (en la rata y en el hombre suele ser mayor de 24 h, mientras que en el ratón y en la ardilla voladora es ligeramente inferior a 24 h). Esta propiedad se aprecia claramente en el registro de actividad alimentaria de la rata Wistar, representado en la figura 2. Si representamos las entradas de una rata a su comedero un día debajo del otro observamos que durante la exposición del animal a un ciclo LO 12:12 la mayoría de las comidas las efectúa por la noche. Ello genera en la gráfica la aparición de una banda vertical más oscura coincidiendo con el periodo de oscuridad. Si en un cierto momento le mantenemos la luz apagada continuamente el animal comienza su periodo de

TIPOS DE RITMOS BIOLÓGICOS

Los ritmos biológicos abarcan una gran gama de frecuencias, desde un ciclo por ms, como el EEG, hasta uno en varios años. Es precisamente esta característica, la frecuencia, la utilizada para identificar las grandes familias de ritmos. Así, en los mamíferos, el cortisol, la insulina y la temperatura, entre otros, muestran ritmos cuyo periodo está próximo a 24 h (concretamente entre 20 y 28 h). Estos ritmos se conocen como circadianos (de alrededor de un día) y son con mucho los más estudiados y los mejor comprendidos. Tienen, también, ritmos más rápidos (su periodo es inferior a 20 h) denominados ultradianos y, por último, también muestran ciclos más amplios (periodo mayor de 28 h) denominados infradianos. A su vez, dentro de esta última categoría se incluyen una gran variedad de ritmos: circaseptidianos (aprox. 7 días), circamensuales (aprox. 28 días) o circanuales (aprox. 365 días).

Figura 2.

Efectos de la luz constante débil (LL) sobre el ritmo de comportamiento alimentario de la rata. Las bandas oscuras representan el tiempo que la rata está comiendo. Para facilitar la observación en cada fila se han representado dos días consecutivos. Del día 1 al 16 el animal estuvo expuesto a ciclos LO 12:12. A partir del día 16 se le mantuvo en condiciones ambientales estrictamente constantes (LL). Nótese la persistencia del ritmo de comidas en estas condiciones; el periodo del ritmo de curso libre fué de 25 h y 10 min.



frecuentes comidas cada día un poco más tarde. Ello produce una banda oblicua hacia la derecha en el registro. En estas condiciones es el ritmo endógeno del animal el que se manifiesta (ritmo de curso libre). Su periodo es, en este caso, de 24 h 50 min.

Capacidad de Sincronización

Aunque como ha quedado claro los ritmos biológicos tienen un origen endógeno, sus características: acrofase, amplitud y periodo, pueden ser modificadas por las variaciones cíclicas de ciertos factores ambientales denominados sincronizadores o "zeitgebers". Dicho de otro modo, cuando un ritmo se desarrolla bajo condiciones ambientales constantes, su acrofase tiene lugar cada día a diferentes horas. Si, por el contrario, se expone a un "zeitgeber", como puede ser el ciclo de LO, al cabo de varios días se llega a una relación estable de fase con el sincronizador, de modo que su periodo se iguala al del "zeitgeber".

En ausencia de sincronizadores las funciones de un animal se encuentran en condiciones de curso libre y cada animal podría presentar un comportamiento diferente a los demás. Esta situación constituiría una fuente de variabilidad en los resultados que no podríamos controlar (Figura 3).

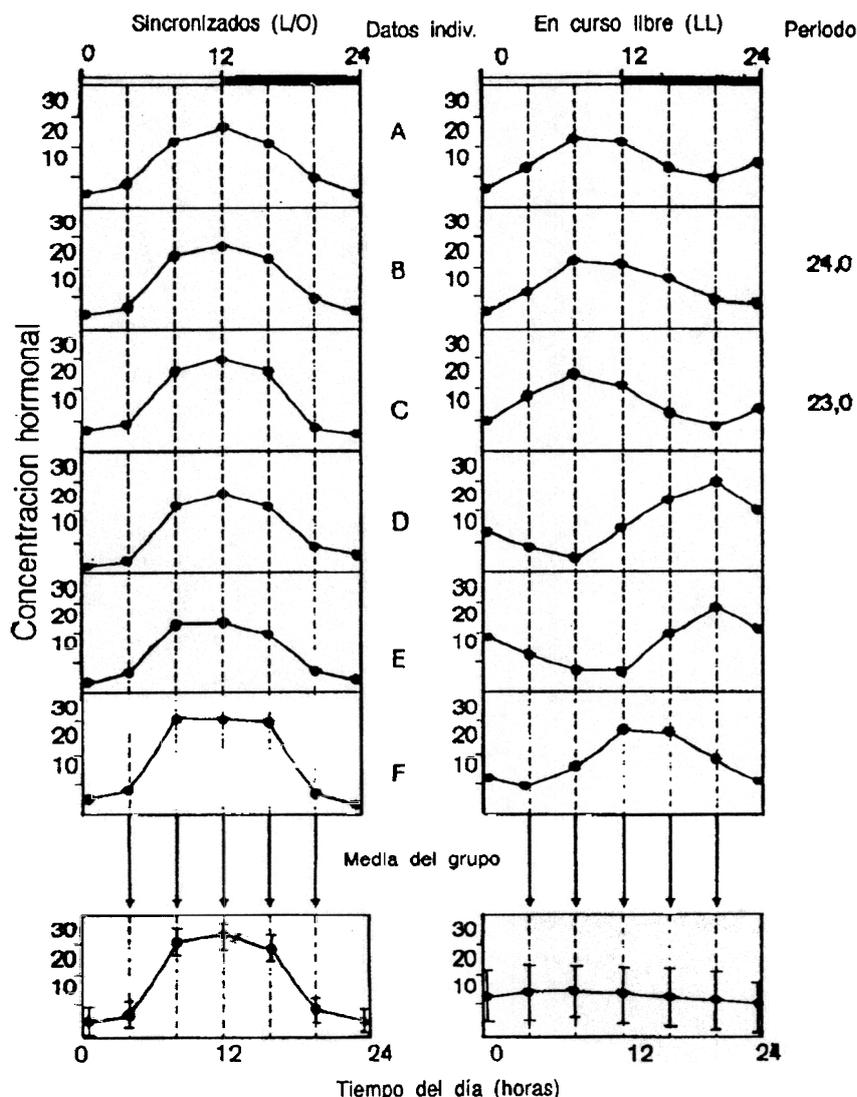
La sincronización a los ciclos de LO se consigue fácilmente aislando las instalaciones donde se alojan los animales de cualquier influencia ambiental y encendiendo y apagando la iluminación siguiendo ciclos de 24 horas. El ciclo más usual es el de 12 h de luz: 12 h de oscuridad, si bien a veces se simulan fotoperiodos más cortos de 10 o incluso 8 h de luz, para que los ciclos de roedores nocturnos se asemejen más a las condiciones en las que vive el hombre. En cualquier caso, en todo trabajo de investigación es imprescindible reflejar las condiciones de sincronización en el que han vivido los animales (Ej. LO 12:12, LO 14:10 etc).

Para la mayoría de los animales el sincronizador más importante son los ciclos de LO con un periodo de 24 h; sin embargo, la sincronización también es posible por la actuación de otras variables cíclicas del ambiente tales como ciclos de alimentación, de temperatura, de ruido, etc.

En relación con el papel jugado por los ciclos de LO hay que destacar el peligro que, para la correcta sincronización de los animales, entraña el que en un determinado momento del periodo de oscuridad se encienda la iluminación del recinto donde se alojan los animales, aunque sólo sea durante unos segundos. En general, sucede que si este

Figura 3.

Valores hipotéticos de concentración hormonal calculados a partir de un grupo de animales sincronizados (izquierda) o en curso libre (derecha). Los animales de la izquierda están todos sincronizados a un ciclo de 12 h de luz y 12 de oscuridad (LO 12:12). Sus ritmos están sincronizados de modo que la media del grupo es un fiel reflejo del patrón rítmico del grupo. Los animales de la derecha se encuentran todos en curso libre. Debido a que sus periodos endógenos son diferentes, los ritmos hormonales de los distintos animales se encuentran desincronizados. Debido a estas diferencias de fase, la media del grupo no refleja los patrones rítmicos de los animales individuales. (Redibujado de Moore-Ede, M.C. y cols. (1982). The clock that time us.p. 26).



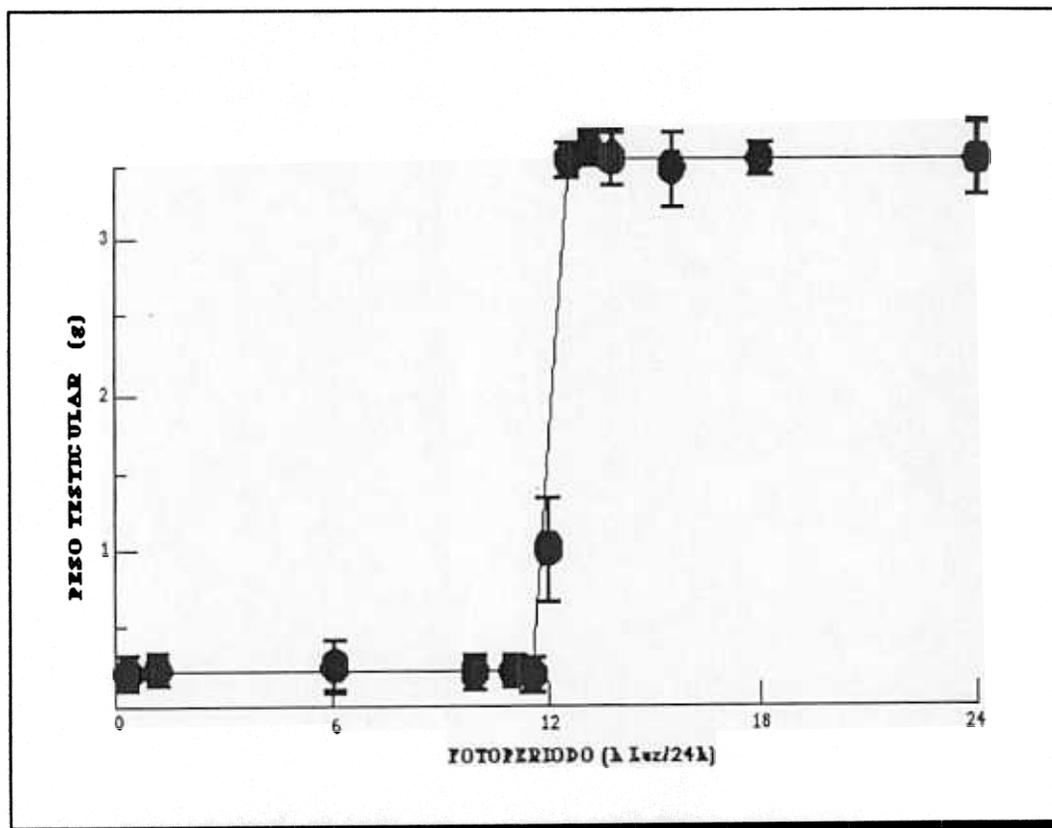
encendido tiene lugar durante la primera mitad de la fase de oscuridad, inducirá en los animales una tendencia a retrasar las acrofases de sus ritmos biológicos, mientras que si tiene lugar en la segunda mitad del periodo de oscuridad producirá un adelanto de fase. Para evitar el peligro que encierran las manipulaciones nocturnas de los animales se suele aconsejar la utilización de una luz roja, como las que se usan en fotografía. No obstante, la luz roja, a pesar de su menor potencia sincronizadora, no está exenta de efectos como zeitgeber. Por ello, si se prevee que se van a realizar manipulaciones nocturnas, lo indicado es mantener la luz roja continuamente encendida durante las 24 h, o, al

menos, durante todo el periodo de oscuridad, de tal modo que no proporcione al animal ninguna información temporal.

Es particularmente importante la influencia que los ciclos de comida-ayuno tienen sobre el sistema circadiano animal. La restricción de la comida a un periodo de 2 horas cada 24 puede desplazar las acrofases de la mayoría de las variables fisiológicas con independencia del ciclo de LO al que los animales hayan sido expuestos. Por tanto, si se quiere evitar el riesgo de la alteración de la sincronización del animal a los ciclos de LO, los animales deberán ser alimentados "ad libitum".

Figura 4.

Respuesta testicular del hámster macho a fotoperiodos comprendidos entre 0 y 24 h de luz en 24 h. Cada punto representa la media \pm EEM del peso testicular de un grupo de hámster sometidos al fotoperiodo indicado en abscisas durante un tiempo previo de 3 meses. Para el mantenimiento del periodo reproductor se precisan fotoperiodos por encima de 12.5 h. (Redibujado de Elliot, J.A. Fed. Proc. 35: 2339-2346, 1976).



La capacidad de sincronización que muestran los animales se viene utilizando desde hace tiempo en la experimentación animal para facilitar el trabajo del investigador. Tal es el caso de la obtención de muestras biológicas durante el periodo de descanso del personal. Esto se puede conseguir desplazando el horario de encendido y apagado de la iluminación de tal modo que la fase luminosa se haga coincidir con el horario de trabajo que nos interese. Este sistema requiere que se tomen algunas precauciones: por un lado, se requiere un largo periodo de adaptación, para unas 12 h de desplazamiento horario se precisan de 2 a 3 semanas; por otro, hay que llevar cuidado con las manipulaciones nocturnas.

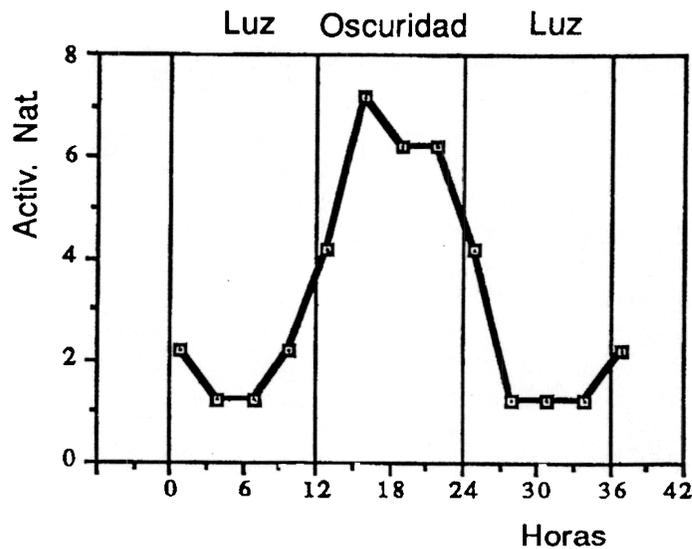
Los sincronizadores son diferentes en lo que respecta a los ritmos ultradianos e infradianos. En el primer caso, si bien persisten en ausencia de señales externas, no suelen estar sincronizados a ningún ciclo ambiental. Quizás la única excepción a esta regla sea la de los organismos marinos sincronizados a los ciclos mareales. La ausencia de sincronizadores ambientales priva a estos ciclos de una cierta estabilidad en sus fases por lo que no se puede predecir con exactitud cuando tendrá lugar el siguiente pico de un ritmo ultradiano.

En el segundo caso, los ritmos infradianos sí suelen permanecer sincronizados a determinados factores ambientales, aunque esta sincronización puede ocurrir de muy diferentes maneras. Los ciclos circalunares, con un periodo de aproximadamente 28 días pueden sincronizarse con algún factor físico ligado al ciclo lunar. Por su parte los ritmos circanuales habitualmente permanecen sincronizados a algún factor cíclico ambiental cuyo periodo sea de un año. Entre todos los existentes, son los cambios anuales en el fotoperiodo (Figura 4) el sincronizador elegido por la mayoría de los organismos para estructurar temporalmente actividades de una gran importancia para la supervivencia de la especie, como son: la época de reproducción, migraciones, hibernación, etc.

Es indispensable saber cómo un sujeto se encuentra sincronizado para poder interpretar las alteraciones eventuales en su estructura temporal. En el caso de un animal, en la práctica, basta conocer las condiciones de iluminación para saber cómo se encuentra sincronizado, por ejemplo luz de 6 a 18 h; oscuridad de 18 a 6 h. En el hombre se utiliza el ciclo de actividad-reposo para conocer su sincronización.

Figura 5.

Actividad de la N-acetil-transferasa (NAT) de pineal de pollo cultivada "in vitro". En la parte superior del gráfico se ha representado el ciclo de LO al que fueron expuestos los animales con anterioridad al sacrificio. (Redibujado de Binkley, 5. y cols. Science, 202:1198-1201, 1978).



Es factible imponer a un organismo un ritmo circadiano diferente de las 24 h mediante la manipulación de sincronizadores. Si por ejemplo exponemos a la rata o al ratón a la alternancia de L=11 h/O=11 h induciremos en estas especies un ritmo circadiano de 22 h. No obstante, en los mamíferos, la sincronización no es posible mas que dentro de unos límites, generalmente entre 20 y 28 h, de tal modo que si se superan estos límites los ritmos circadianos escapan a la sincronización y se manifiestan como ritmos de curso libre.

Origen Multioscilariorio

El carácter endógeno de los ritmos biológicos ha impulsado gran número de investigaciones encaminadas a la localización de los relojes biológicos que gobiernan estos ritmos. Recientemente se ha podido demostrar que los organismos superiores, como los mamíferos, están dotados de mecanismos, los relojes biológicos centrales (también llamados osciladores o marcapasos) que gobiernan un conjunto de ritmos biológicos. Este es el caso del núcleo supraquiasmático del hipotálamo, que aparece como el marcapasos circadiano predominante. Va a controlar los ritmos circadianos de ACTH, prolactina, del ciclo sueño-vigilia, la temperatura corporal, etc. Otros osciladores parecen localizarse en la glándula pineal, que controla el ritmo de la melatonina y el de los ciclos reproductores de muchos mamíferos; en la glándula adrenal, que produce el ritmo de cortisol plasmático; en el núcleo ventromedial del hipotálamo, relacionado con los ritmos de comida, etc.

NIVELES DE MANIFESTACION DE RITMOS BIOLÓGICOS

Dado que la manifestación de los ritmos biológicos es tan amplia, recordemos que éstos aparecen en todos los se-

res vivos, y, dentro de cada organismo, en todos sus niveles de organización, la enumeración de las variables en las que se manifiestan rebasaría con mucho los límites de esta revisión. Sin embargo, es importante que el investigador tenga una noción de dónde y cómo pueden aparecer estos ritmos. Tres son en principio los ámbitos en los que pueden manifestarse: a nivel celular, a nivel de tejidos y órganos y a nivel del organismo completo. Esta división, aunque es adecuada para los fines descriptivos de esta revisión, no debe ser tomada en cuenta de una forma demasiado estricta ya que los tejidos dependen de las células, el organismo completo de sus tejidos y órganos, etc.

Ritmos Celulares

En metazoos se han puesto de manifiesto numerosos ritmos circadianos utilizando órganos o tejidos en condiciones "in vitro", sin embargo, mucho más rara ha sido la demostración de que persisten en cultivos celulares. Un ejemplo particularmente interesante ha sido demostrado en cultivos de células pineales de pollo. Los pinealocitos de ave son capaces de mantener la periodicidad circadiana del enzima N-acetil transferasa (NAT), enzima responsable del la producción rítmica de la melatonina pineal in vivo (Figura 5). Esto ocurre además en una suspensión de células parcialmente dissociadas, lo que sugiere que cada célula contiene su propio reloj para la producción cíclica de NAT, y que, por tanto, básicamente, la secreción rítmica de melatonina en la pineal de pollo se debe a los esfuerzos coordinados de todos sus "relojes" celulares individuales.

Ritmos en Tejidos y Organos

Los ritmos de variables fisiológicas, aunque sean el producto de un determinado tejido, se determinan habitualmente en un organismo completo, por lo que se hace difícil dissociar el papel de determinados tejidos en su

Figura 6. Mapa de fases de algunos ritmos circadianos del ratón (*Mus musculus*). Con un punto y una barra oscura se ha representado la media \pm EEM de las acrofasas (item po en el que ocurre el máximo valor de una variable). Los animales se sincronizaron

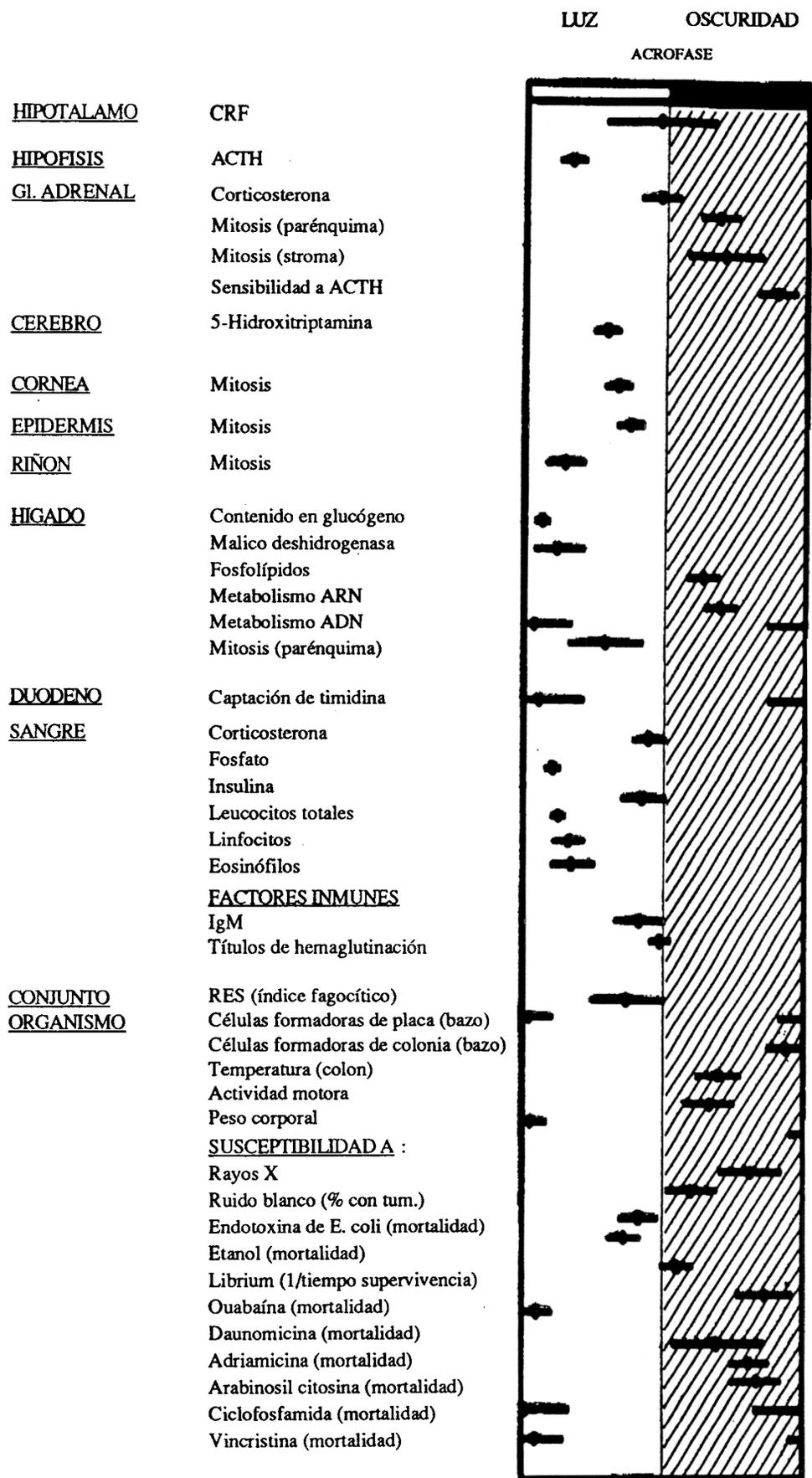
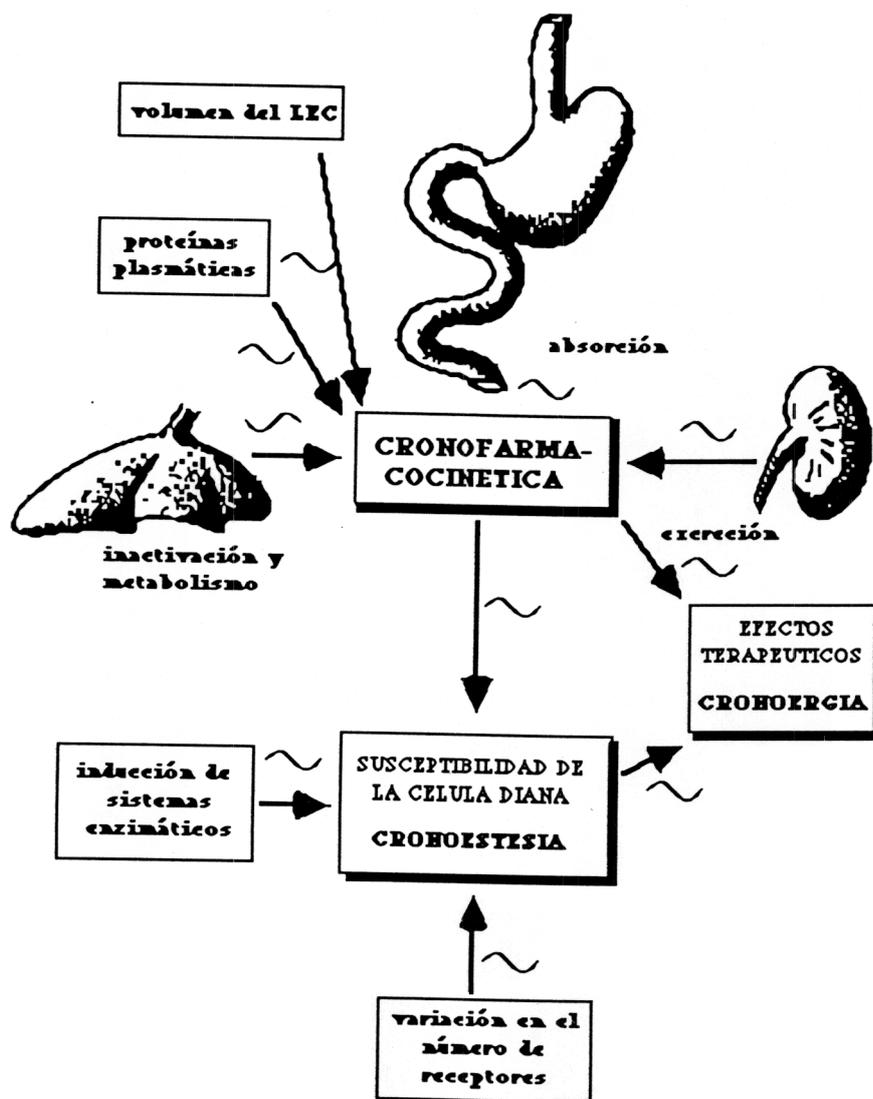


Figura 7.
Ritmos en funciones corporales implicados en los ritmos en la eficacia y toxicidad de las drogas.



aparición. No obstante vamos a comentar algunos ejemplos de ritmos pertenecientes a esta categoría (Figura 6).

-Ritmos endocrinos. Debido al papel que juegan en la coordinación de las funciones corporales, uno de los ritmos más importantes del organismo son los ritmos endocrinos. La determinación de las oscilaciones circadianas en la actividad endocrina se ha abordado de cuatro maneras:

a) Mediante el sacrificio, la extracción de glándulas endocrinas y el análisis de su actividad hormonal en una muestra de animales previamente sincronizados.

b) Mediante la determinación de los niveles urinarios de hormonas o sus metabolitos.

c) Realizando determinaciones seriadas de los niveles de hormonas en sangre, y

d) cultivando en un medio apropiado el tejido endocrino y midiendo su secreción en el fluido del baño. Actualmente casi todas las hormonas que se han examinado han mostrado ritmicidad circadiana.

En vertebrados hay algún ejemplo particularmente interesante que merece la pena ser comentado aquí. Cuando se aísla la glándula adrenal de hámster y se le mantiene largo tiempo en un cultivo de órganos, ésta muestra un claro ritmo circadiano en la producción de esteroides. La administración de pulsos de ACTH es capaz de desplazar bruscamente estos ritmos, indicando que si bien en el organismo completo es el hipotálamo el que controla el ritmo de cortisol, la propia glándula adrenal es capaz de generar el ritmo.

La forma que muestran los ritmos endocrinos ha variado a medida que se han puesto a punto nuevas técnicas de determinación de la actividad hormonal. Hace algunos años la mayoría de los ritmos endocrinos parecían tener un perfil casi sinusoidal, sin embargo, cuando se ha analizado la secreción hormonal de forma continua se ha podido comprobar que ésta es casi siempre episódica. Los pulsos secretores son breves y su frecuencia e intensidad

varían ampliamente a lo largo de las 24 h. En el hombre está demostrado que al menos cuatro sistemas hipotálamo-hipofisarios (ACTH-cortisol, hormona de crecimiento, prolactina y LH) funcionan de este modo.

-Ritmos excretorios. Los ritmos que aparecen en los constituyentes urinarios tienen dos orígenes:

a) cambios en la actividad excretora renal (filtración glomerular y captación tubular),

b) cambios en los niveles sanguíneos de metabolitos, hormonas, electrolitos, etc. Además, estos ritmos urinarios son fácilmente enmascarados ("masking effect") por la propia ingesta de alimento, la ingestión de agua, la postura corporal, etc., lo que puede llevar a errores en la interpretación de los resultados.

En el hombre, el Na^+ , K^+ , Cl^- y H^+ muestran niveles plasmáticos prácticamente constantes, sin embargo aparecen rítmicamente en orina, la causa aparente de ello es que el riñón los excreta más activamente durante el periodo diurno. Este efecto puede estar causado por una combinación de factores, unos inherentes a las células renales y otros inducidos en las células tubulares renales por hormonas como ADH y cortisol. Sin embargo, hay otros iones, como el Ca^{++} y Mg^{++} y metabolitos, como la urea, ácido úrico o metabolitos de las hormonas corticosteroides, cuyos niveles plasmáticos varían ampliamente y que alcanzan unas concentraciones urinarias en una proporción que refleja sus concentraciones plasmáticas. Otra característica importante de la ritmicidad renal es la fuerte reducción que se produce en el volumen urinario durante el periodo de reposo, nocturno o diurno según los hábitos de la especie. Este efecto no se puede achacar únicamente a la reducción en la ingestión de agua durante la noche, ya que se sigue produciendo en individuos que ingieren durante las 24 h, a intervalos constantes, pequeñas cantidades de agua.

Ritmos en el Animal Completo

Como hemos podido ver, la ritmicidad que aparece en los tejidos es el resultado de la capacidad que tienen sus células de medir el tiempo. Del mismo modo los ritmos que aparecen en el animal completo son, a su vez, el producto de la actividad marcapasos de los tejidos. Sin embargo, hay cuatro categorías principales de ritmos que en la práctica sólo son identificables en el animal completo. Estos son: los ritmos metabólicos, los de sensibilidad química, los ritmos del desarrollo y los de comportamiento.

Ritmos Metabólicos

El hígado de los roedores ha sido utilizado por muchos investigadores como modelo para el análisis de la ritmicidad metabólica circadiana, hecho que no es accidental por ser este órgano uno de los más extensamente estudiados por la bioquímica de los organismos eucariotas.

Los principales enzimas clave en la degradación de los aminoácidos y en la gluconeogénesis muestran actividades variables a lo largo del nictámero. Llama la atención el hecho de que estas enzimas alcancen su máxima actividad aproximadamente a la misma hora del día, en la primera mitad del periodo de oscuridad, lo que pone una vez más de

manifiesto la estrecha correlación temporal de diferentes funciones reguladoras relacionadas.

Las enzimas responsables del metabolismo del glucógeno muestran también amplias oscilaciones en sus niveles, lo que lógicamente se refleja en variaciones en la cantidad de glucógeno almacenado en hígado y en la glucemia. La acrofase para el contenido en glucógeno ocurre en la rata hacia las 2 h, coincidiendo con el máximo de la glucógeno sintetasa y el mínimo en la glucógeno fosforilasa. También estos ritmos se mantienen en condiciones de ayuno.

La existencia de un ritmo en el metabolismo de los lípidos es un hecho conocido desde las investigaciones de Holmgren en Ig32. En la rata hay un claro predominio de los procesos lipogénicos durante la noche, mientras que durante el día es la lipólisis la que predomina. Por su parte en animales diurnos estos procesos están desplazados 12 h.

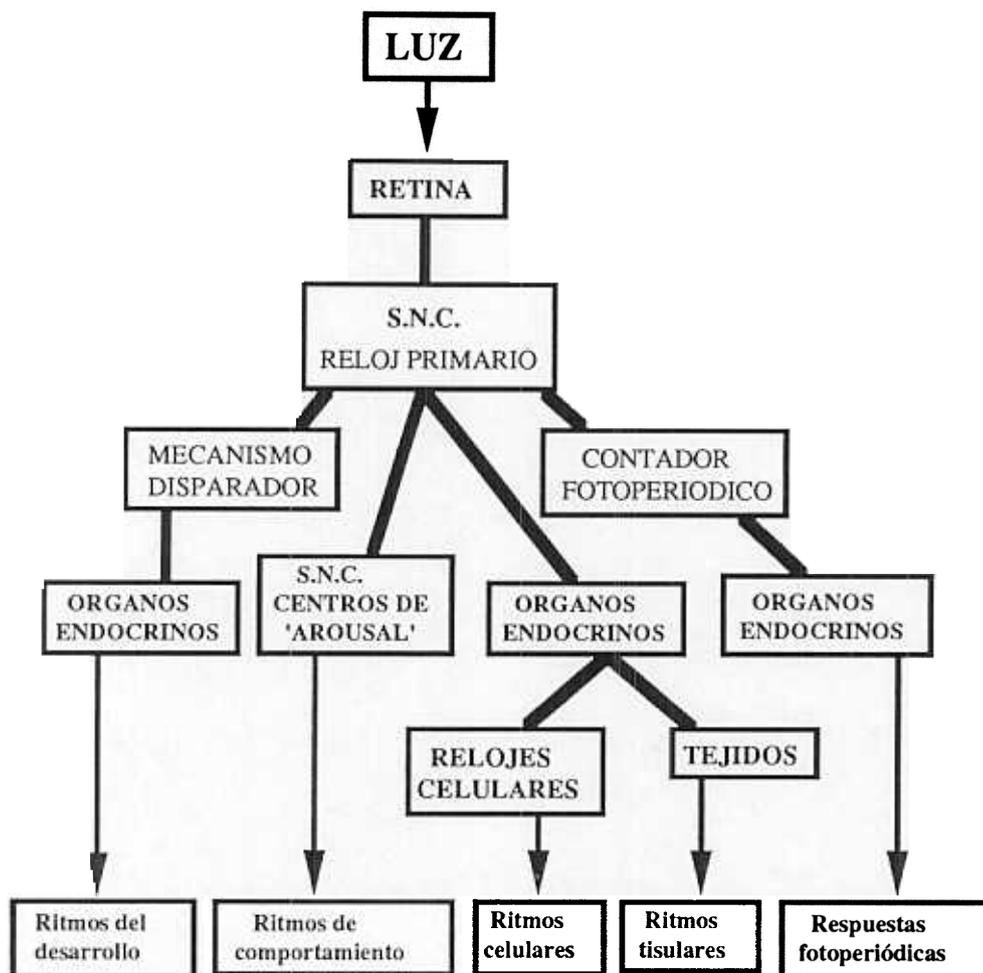
Tampoco la síntesis protéica es, en modo alguno, un proceso ajeno a estas oscilaciones. Cuando se mide la incorporación de leucina H3 en proteínas de hígado de rata se detecta un ritmo circadiano con una acrofase aproximadamente a las 22 h y un mínimo entre las 8 y las 12 h.

Ritmos en la sensibilidad a agentes químicos

Dado que un organismo vivo es un sistema bioquímico y funcional diferente según el momento del día del que se trate no es sorprendente, por tanto, que los efectos terapéuticos y tóxicos de un fármaco sean diferentes de acuerdo con el momento en que se administra. No obstante, en farmacología el concepto "homeostático" del organismo es el que sigue primando actualmente. Según el mismo, los efectos de un medicamento son constantes con independencia del momento del día en que se aplica. Por ejemplo, en todos los tratados clásicos de esta disciplina, la evaluación de la toxicidad de un medicamento, en una forma y vía de administración determinados, toma como referencia la dosis letal 50. Se trata de aquella dosis que causa la muerte del 50 % de los animales de una especie, sexo, edad y peso determinados. Esta antigua definición no tiene en cuenta ni la hora de administración del agente potencialmente tóxico, ni la sincronización de los animales, es decir, en la práctica, el ciclo de LO al que están sometidos. Hoy día se sabe que la DL50 debe completarse con puntualizaciones cronotoxicológicas. En efecto, ya en 1958 Franz Halberg realizó el siguiente experimento: tomó ratones de una cepa genéticamente definida, similares en edad, sexo y peso, sincronizados mediante la alternancia de 12 h de luz y 12 de oscuridad. Cada 4 h, durante 48 h, 20 ratones recibieron una dosis única de endotoxina de *E. coli*, de tal modo que la diferencia entre un lote y otro era la hora del tratamiento. Como índice de toxicidad se tomó la mortalidad observada en cada lote. En esta situación observaron que la dosis de endotoxina capaz de provocar la muerte del 80% de los ratones a las 16 h, dejaba con vida al 90% de los mismos si se les inyectaba cerca de la media noche.

La efectividad de una droga va a venir dada en función de sus tasas de absorción, metabolismo y excreción, del

Figura 8.
Organización jerárquica del sistema circadiano animal. Las bandas oscuras representan conexiones nerviosas directas; las flechas, mecanismos de acoplamiento hormonales o de otro tipo. (Redibujado de Brady, J. (1979). Biological clocks. Arnold. Londres).



grado de dilución en los tejidos corporales donde se distribuye y de la susceptibilidad del tejido diana (Figura 7). Los ritmos circadianos en cada uno de estos factores contribuyen a la variación circadiana en la respuesta terapéutica.

La tasa de absorción de cualquier droga administrada oralmente depende, en parte, de la cantidad de alimento que haya en el estómago, con la consiguiente variación entre animales nocturnos y diurnos. Pero también en ausencia de alimento hay ritmos en la acidez gástrica y en la actividad enzimática intestinal. Todo ello contribuye a que las tasas de absorción en el tracto gastrointestinal cambien con el tiempo.

Una vez que el fármaco ha penetrado en el interior del organismo éste se liga con mayor o menor afinidad a las proteínas plasmáticas que lo inactivan temporalmente. La fracción libre es la única difusible y por tanto la farmacológicamente activa. Esta fijación depende de numerosos factores farmacológicos, en particular de la hora de administración del fármaco. Muy relacionado con este factor está la variación circadiana que existe en el volumen sanguí-

neo y en el volumen extracelular, contribuyendo con un efecto adicional a la modificación del grado de dilución del fármaco.

La existencia de variaciones circadianas en las tasas de inactivación y metabolismo está bien documentada, por ejemplo, al examinar las actividades de enzimas hepáticas responsables de la inactivación del hexobarbital, la hexobarbital oxidasa hepática muestra un ritmo inverso al de la actividad anestésica de este medicamento. La actividad máxima de esta enzima corresponde al momento en el cual los animales permanecen menos tiempo anestesiados. Las tasas de excreción también están sujetas a variación circadiana; por ej. la excreción urinaria de salicilato en hombres sanos muestra un ritmo circadiano, de tal modo que la menor excreción ocurre por la mañana. Estas variaciones en la excreción urinaria se relacionan probablemente con el ritmo en la acidez urinaria. La orina excretada durante la noche es más ácida que la producida por el día.

Todos los factores mencionados anteriormente tienen un efecto neto sobre la variación circadiana de la concentración de una droga que llega al órgano diana. Pero, ade-

más, existe un ritmo en la susceptibilidad de la célula diana ya que se producen cambios en la densidad de receptores celulares o incluso en la inducibilidad de sistemas enzimáticos celulares.

Lo expuesto anteriormente pone de manifiesto que multitud de factores, cada uno con su propio ritmo circadiano, influyen sobre la efectividad de la droga. Son precisamente aquellos campos de la farmacología en los que los efectos adversos de los fármacos son más intensos los que muestran un más rápido desarrollo de la Cronofarmacología aplicada. Tal es el caso de la quimioterapia oncológica, de los tratamientos inmunosupresores, de la medicación frente al asma bronquial, de los fármacos anticoagulantes, de los hipotensores, etc.

Ritmos en el desarrollo

Hay un tipo de acontecimientos fisiológicos que sólo ocurren una vez en la vida de un individuo y que sin embargo están controlados a su vez por el sistema circadiano. Tal es el caso del momento del nacimiento y muda de artrópodos, la pubertad de mamíferos, la muerte, etc. Este tipo de fenómenos, lógicamente, no puede ser detectado como un ritmo en un solo individuo, sino que solamente se pone de manifiesto cuando se estudian poblaciones.

El momento en la vida de un mamífero en el que tiene lugar la pubertad está fuertemente condicionado por el sistema circadiano. En todas las especies estudiadas la melatonina, hormona producida cíclicamente por la glándula pineal, muestra un amplio ritmo circadiano, caracterizado por bajos niveles diurnos y elevados valores nocturnos. Además, al menos en el hombre, se ha demostrado que se produce un descenso progresivo en la melatonina sérica desde el momento del nacimiento hasta la presentación de la pubertad, momento en el cual los niveles de melatonina se estabilizan en unos valores similares a los del adulto. Este efecto antigonadal de la melatonina también se ha demostrado que ocurre en la rata, especie que, al igual que el hombre, muestra un único periodo de maduración sexual en su vida. La melatonina en la rata se ha visto que es capaz de retrasar la pubertad, inhibiendo la liberación de FSH y LH, pero solamente cuando el indol pineal se inyecta en determinados momentos del ciclo circadiano, la misma dosis de melatonina administrada a otras horas es ineficaz para alterar la época de maduración gonadal. Esto viene a corroborar un hecho demostrado para otras muchas sustancias y es que el momento del día en que se administra una hormona influye en su efectividad. Probablemente la maduración del sistema circadiano de la rata tenga mucho que ver con la época de aparición de la pubertad ya que la pubertad y el momento en que el patrón rítmico de actividad motora y de ingesta de alimento alcanzan el estado adulto son coincidentes.

Ritmos de comportamiento

Desde hace mucho tiempo se conoce que los ritmos circadianos más evidentes en los animales son aquellos que tienen lugar en fenómenos de conducta. Entre éstos, los ciclos de actividad-reposo, el comportamiento alimentario y la ingestión de agua son, por este orden, las tres variables comportamentales más estudiadas.

Uno de los fenómenos rítmicos más evidentes entre los animales es la distribución circadiana de los periodos de actividad y reposo y de sueño y vigilia. La alternancia de luz y oscuridad es el sincronizador circadiano predominante en este ciclo, sin embargo, cuando se elimina su influencia, por ejemplo mediante el cegamiento de las ratas, éstas continúan mostrando un patrón circadiano de actividad-reposo, aunque habitualmente se produce un desplazamiento de fase.

La conducta alimentaria también ocurre de una forma periódica y en la mayoría de las especies es claramente circadiana. Ratas adultas, mantenidas con un ciclo de 12 h de luz y 12 de oscuridad ingieren entre el 80 y 90 % de su alimento por la noche. Estos ritmos de ingesta de alimento persisten bajo gran cantidad de condiciones. Continúan durante la privación de agua, aunque con una ingesta total reducida. Durante la lactación, cuando las demandas de energía y alimento se duplican o triplican, el ritmo circadiano se sigue manteniendo, pero proporcionalmente se ingiere más alimento durante el día.

La capacidad de mostrar anticipación al momento en el que el alimento estará disponible es una de las características de los ritmos circadianos de ingesta. En la naturaleza esta anticipación es importante pues a menudo el animal ha de emprender un viaje desde el lugar donde duerme hasta donde obtendrá el alimento. Recientemente se ha demostrado que la capacidad de anticipación a la disponibilidad de alimento está controlada por un marcapasos diferente a los núcleos supraquiasmáticos, probablemente los núcleos ventromediales del hipotálamo.

La ingestión de agua también muestra un fuerte ritmo circadiano. Debido a su relación con los ciclos de actividad-reposo y comida-ayuno la mayor parte del agua se ingiere durante el periodo principal de actividad del animal, coincidente con el periodo de máxima ingesta de alimento. Sin embargo, estos dos ritmos, de ingesta de alimento y de bebida, no dependen totalmente uno del otro sino que en determinadas circunstancias se pueden desacoplar. Una diferencia importante entre la organización temporal de la comida y de la bebida es que mientras que la disponibilidad de alimento puede actuar como un agente sincronizador del sistema circadiano, la disponibilidad de agua no. La restricción del agua a unas pocas horas cada día no sincroniza los ritmos circadianos de curso libre del mono, de la ardilla o de la rata.

Organización del Sistema Circadiano de Mamíferos

Muchas células de metazoos complejos no son rítmicas únicamente cuando están en el animal intacto, sino que pueden mantener sus características rítmicas cuando se mantienen en un cultivo. Aparentemente cada célula de un organismo complejo posee su(s) propio(s) reloj(es) circadiano(s), presumiblemente heredados de un protista ancestral. Sin embargo, cuando se incorporan a un tejido, las células no sólo cooperan para desempeñar la función normal del tejido, sino que lo hacen de una forma coordinada de manera que los relojes celulares oscilan al unísono.

Quizás la mejor forma de exponer cómo se organiza el sistema circadiano sea la que se ha esquematizado en la

figura 8. Este esquema supone que existen unos marcapasos "primarios" (núcleos supraquiasmáticos, glándula pineal), sincronizados mediante la actuación de la luz a través de la retina, que, a su vez, actúan sobre unos marcapasos de segundo orden, principalmente las glándulas endocrinas. Las secreciones rítmicas de las glándulas endocrinas pueden conducir o sincronizar los relojes jerárquicamente inferiores localizados en otros tejidos o en células individuales, o bien actuar sobre tejidos incapaces de oscilar por sí mismos. Como resultado de estos procesos se van a producir los diferentes tipos de ritmos que aparecen en un organismo.

CONSIDERACIONES METODOLOGICAS EN EXPERIMENTACION ANIMAL

Una de las claves básicas de toda experimentación científica es la posibilidad de reproducibilidad de los resultados de un experimento, siempre que éste se desarrolle en unas determinadas condiciones prefijadas. Otra es la posibilidad de deslindar los efectos de un "tratamiento" comparando sus efectos con los de los correspondientes animales sometidos a un "placebo". Las dos situaciones únicamente podrán ser rigurosamente científicas si todas las variables, con la excepción lógicamente de todas aquellas que se quieran hacer intervenir, se mantienen estrictamente constantes o, al menos, controladas. Sin embargo, aún hoy nos encontramos con que no se toma en consideración el factor tiempo como una variable más que, junto con el sexo, especie, edad, etc. pueda afectar a los resultados tanto cuantitativos como cualitativos de un experimento. Para tratar de evitar este error expondremos a continuación una serie de consideraciones que a modo de lista de chequeo se deberían tener en cuenta a la hora de diseñar y publicar un trabajo científico. Aunque esta lista no existe de manera formal, los elementos metodológicos que debería comprender han sido formulados hace algunos años a partir de estudios cronobiológicos y recopilados por el Dr. Alain Reinberg. Las consideraciones marcadas con un asterisco (*) son únicamente imprescindibles en estudios de Cronobiología.

1. (*)¿La recogida de datos o muestras se ha de hacer de forma longitudinal o transversal?

El estudio de una oscilación temporal obliga a trabajar a partir de datos obtenidos en diferentes momentos del ciclo. Tomando como ejemplo el ritmo circadiano, la cuantificación de éste en una variable fisiológica o biológica requiere como mínimo la obtención de datos cada 4 h a lo largo de 24 h. Para ello se puede proceder de forma transversal, por ej. obteniendo datos de 10 animales diferentes cada 4 horas (60 datos en 60 animales) o de forma longitudinal, obteniendo datos en un solo animal cada 4 horas a lo largo de 10 días (60 datos en un animal). En principio los dos modos de recogida de datos son correctos, sin embargo, el primero permite conocer las características de una muestra de sujetos estandarizados y, por tanto, comparables entre ellos.

2. (*)¿Muestreo serialmente dependiente o independiente?

Las variaciones circadianas de la concentración plasmática de una sustancia pueden ser estudiadas a partir de las tomas de sangre realizadas mediante la colocación de un catéter en un pequeño número de animales (> 6 animales) de tal modo que para cada animal podemos obtener 6 valores a lo largo de 24 h (si el muestreo se realiza cada 4 h) (muestreo serialmente dependiente), o bien podemos obtener la sangre tras decapitación de un determinado número de animales (> 6 animales) cada 4 h. En este caso cada animal sólo proporcionará un dato (muestreo serialmente independiente). En principio estos dos modos de muestreo producen resultados coherentes, sin embargo, a menudo no siempre es posible elegir entre ambos modelos. Por ejemplo, si lo que pretendemos es estudiar la variación circadiana de ciertos receptores cerebrales, o la realización de determinados estudios cronotoxicológicos, nos veremos obligados al muestreo serialmente independiente.

3. Especificación de la especie y subespecie, variedad y cepa estudiada

El papel de los diferentes osciladores centrales puede variar de una especie a otra, incluso entre especies consideradas como vecinas. Además, dentro de la misma especie existen variaciones importantes en lo que se refiere a sus ritmos biológicos. Por ejemplo, se han aislado mutantes de *Drosophila melanogaster* que se distinguen entre ellos por las modificaciones del periodo de sus ritmos circadianos dependientes del gen "per" localizado en el cromosoma X. Y si bien es cierto que los genes que controlan las propiedades de los ritmos biológicos en aves y mamíferos no han sido hasta el momento identificados, sí son evidentes las variaciones que se producen en ciertas variedades dentro de una misma especie. Este es el caso de las ovejas en lo que respecta a su sensibilidad a los cambios en el fotoperiodo responsables de la inducción de su reproducción.

4. Especificación del sexo

Son muchos los trabajos que han puesto de manifiesto la existencia de diferencias sexuales en los ritmos circadianos y circanuales de muchas variables. Se han observado en la *Drosophila*, en mamíferos de laboratorio e incluso en el hombre. Así, por ejemplo, en el hombre se ha detectado un ritmo anual para la prolactina, mientras que no lo ha sido en la mujer.

5. Especificación de la edad y del peso

Los ritmos circadianos fetales y de las crías son muy diferentes de los del animal adulto. Se precisa una cierta maduración del sistema nervioso para que se produzca la expresión de los ritmos circadianos y para que muestren capacidad de ser sincronizados por los zeitgebers ambientales. El embrión ya suele mostrar ritmos circadianos entrenados por la madre, sin embargo en el recién nacido,

estos ritmos desaparecen dando paso a ritmos en el dominio de frecuencia ultradiano para poco a poco ir apareciendo de nuevo los ritmos circadianos. Al final de la vida, en el animal viejo, los ritmos circadianos pierden gran parte de su amplitud.

La edad de paso de la periodicidad ultradiana a la circadiana, en función del crecimiento, difiere de una variable a otra en la misma especie y de una especie a otra para la misma variable. En la rata Wistar, por ejemplo, el ritmo circadiano característico del adulto, para la temperatura corporal, actividad motora y comportamiento alimentario, se alcanza hacia los 40-45 días de edad.

6. Especificación de la sincronización circadiana

El conocimiento de los ciclos de LO utilizados para la sincronización de los animales, así como las horas en las que se ha efectuado el experimento son necesarios para la interpretación correcta de los valores obtenidos para cada variable. Esto es particularmente importante en toxicología y en farmacología, en la medida en que los roedores, que son activos durante la noche, pueden servir como modelos para el hombre que es activo durante el día.

Se admite generalmente que para la sincronización adecuada de los animales es suficiente con un ciclo de LO estabilizado durante 8 o más días, sin embargo, si los animales han sido sometidos a un desplazamiento de fase de más de 6 horas se precisa más tiempo para conseguir su sincronización. Como regla general, se puede establecer un tiempo mínimo de sincronización de al menos dos días por cada hora de desplazamiento a que haya sido sometido el animal.

Tampoco conviene olvidar el poder de sincronización que tienen otras variables rítmicas del ambiente, como la presencia y ausencia de alimento, la presencia y ausencia de la madre, etc.

7. Especificar los posibles factores enmascarantes del ritmo

Muchos factores del ambiente, no necesariamente rítmicos, pueden modificar las características de un ritmo, e incluso pueden hacer aparecer un ritmo donde no lo había anteriormente. Este es el caso de muchos ritmos digestivos en el perro, cuya aparición y características son fuertemente dependientes de la hora en la que se le da de comer.

También, la simple manipulación, durante algunos minutos, del animal de laboratorio, incluso si ésta se repite diariamente de modo que el animal se "habitúe" a ella, puede modificar la forma de la curva del ritmo circadiano de la corticosterona. Además el efecto de esta manipulación es mucho más acentuado a unas horas que a otras.

8. Especificación de la sincronización anual

Los animales, mantenidos en condiciones ambientales constantes a lo largo de todo el año, ciclos de L/D=12/12, temperatura y humedad fijas, etc., muestran ritmos anuales persistentes en numerosas variables. Quiere ésto decir que la acrofase, amplitud y mesor de un ritmo circadiano, puede cambiar en función de los meses del año. Son

numerosos los experimentos en los que se constata que la vulnerabilidad de los roedores a agentes tóxicos o a antibióticos varía en el curso de un año. Resulta, por tanto, indispensable saber la época del año en la que se han realizado los experimentos, incluso si los factores ambientales en el animalario se han mantenido constantes. Además, en la medida en que la acrofase circadiana de un ritmo se pueda desplazar a lo largo del año, es absurdo pensar que realizando el experimento todos los días a la misma hora podemos evitar la interferencia de los ritmos circadianos.

9. Especificación de las horas del día en que se realiza el experimento

Como ya se ha expuesto en varios lugares de este artículo, el momento del día, en relación con el ciclo LO en que se mide una variable influye poderosamente en los resultados obtenidos, y no sólo de un modo cuantitativo. Por ejemplo, la noradrenalina inyectada en el hipotálamo lateral puede estimular el consumo de alimentos si se administra al inicio de la fase de actividad. Pero la misma dosis de noradrenalina puede disminuir el consumo de alimento si se administra al inicio de la fase de reposo.

Sabemos que la mayoría de los roedores de laboratorio (rata, ratón, hámster) presentan generalmente un máximo de actividad nocturna. Sin embargo, se puede constatar que solamente un tercio de los artículos publicados en 1987 en revistas de alto nivel del área de Etología se han realizado durante el periodo de oscuridad del roedor. Por el contrario, los dos tercios restantes se han realizado cuando el animal se encontraba en su periodo de reposo diurno.

10. (*) Recurso a los ritmos marcadores para las comparaciones intra e inter específicas.

En todas las especies animales existen ritmos marcadores que constituyen índices de la organización temporal del resto de los ritmos que muestra el animal. Así, las acrofases de la corticosterona y de la temperatura corporal, la mitad del periodo de sueño, o el comienzo del periodo de actividad, pueden servir de referencia de fase para localizar las acrofases circadianas de otras funciones. De este modo se pueden realizar comparaciones intra e inter específicas ya que se tiene en cuenta la estructura temporal de la especie.

CAMPOS DE APLICACION DE LA CRONOBIOLOGIA Y PERSPECTIVAS FUTURAS

La Cronobiología es claramente una ciencia multidisciplinar. Este carácter multidisciplinar constituye a la vez un factor de enriquecimiento y de desmembramiento para una determinada ciencia. Desde nuestro punto de vista, la Cronobiología es claramente una nueva ciencia. Si para definir a una nueva ciencia se precisa el que ésta posea unos objetivos y una metodología propia, ésto ocurre con la Cronobiología. La Cronobiología posee unos objetivos específicos no cubiertos por ninguna otra ciencia, el estudio de la organización temporal de los seres vivos, de sus

mecanismos y de sus alteraciones. Además, si bien utiliza métodos que son propios de otras ciencias, el diseño experimental diferenciado y el análisis de resultados basado en el estudio de series de tiempo, constituyen su metodología particular. Nos encontramos por tanto, con una ciencia que se encuentra a caballo entre las disciplinas que estudian la forma, en este caso la organización en el tiempo de los procesos que tienen lugar en un ser vivo, y la función, puesto que se ocupa de los mecanismos que generan los ritmos.

Los campos de aplicación de la Cronobiología son tan amplios como los que abarca la biología, sin embargo con el fin de no extendernos más allá de los objetivos de este artículo, únicamente comentaremos aquellos en los que se producen un mayor número de aportaciones.

En el nacimiento de la Cronobiología ha tenido mucho que ver la Fisiología, por ello, la Cronofisiología es una de las áreas que han sido más decisivas a la hora de aportar un sólido cuerpo de doctrina que ha permitido el desarrollo posterior de la Cronobiología. El estudio de las propiedades de los ritmos biológicos, la descripción de los ritmos que tienen lugar en los principales sistemas fisiológicos, y el descubrimiento de algunos "relojes biológicos", han sido algunas de las aportaciones más importantes de la Cronofisiología.

Por su parte, la Cronopatología se ha desarrollado alrededor de tres campos de estudio: los ritmos que se producen en las manifestaciones patológicas (epilepsia, úlcera péptica, etc.), las patologías que producen una alteración de los ritmos (diferentes tipos de cáncer producen determinados ritmos marcadores específicos), y, finalmente, las patologías producidas por alteraciones en la estructura temporal (jetlag, desincronización por trabajo a turnos, insomnio por retraso de fase, etc.).

Uno de los mayores campos en los que ha encontrado su aplicación la Cronobiología es el de la Cronofarmacología y Cronotoxicología. El descubrimiento de que los efectos terapéuticos y tóxicos de una droga variaban según ritmos circadianos y circanales constituyó el paradigma sobre el que se ha desarrollado la Cronofarmacología. Las variaciones circadianas en la concentración que alcanzan los medicamentos en los humores (cronofarmacocinética), las variaciones circadianas en la susceptibilidad de los tejidos diana (cronestesia) y los ritmos circadianos en los efectos cuantitativos y cualitativos de los medicamentos (cronoergia), constituyen los tres conceptos básicos sobre los que se asienta la Cronofarmacología. La optimización de los medios terapéuticos mediante un esquema cronofarmacológico apropiado se nos aparece, pues, como un método nuevo, con un gran interés teórico y práctico. Con toda seguridad, los enfermos crónicos que padecen asma, afecciones reumáticas, trastornos psiquiátricos y cáncer podrán beneficiarse en los próximos años de las ventajas de la Cronoterapéutica.

Lo expuesto anteriormente para un fármaco es igualmente válido para un nutriente. La existencia de ritmos en el metabolismo, en la absorción, en la eficacia de los procesos digestivos, y en el mismo comportamiento alimentario constituyen las bases de los estudios sobre Crononutrición.

Los recientes avances experimentados por la bioquímica y la biología molecular no se han mantenido ajenos a la Cronobiología. Los ritmos que aparecen en las estructuras subcelulares, los ritmos en actividades enzimáticas "in vivo" e "in vitro", así como la localización de algunos genes y la identificación de proteínas implicadas en la génesis de ritmos biológicos son algunos de las líneas de trabajo de la Cronobioquímica.

La constatación de que al igual que sucede con muchos procesos fisiológicos, también los procesos mentales, tanto normales como patológicos, tienen una estructura temporal determinada es lo que ha permitido en los últimos años el desarrollo de una potente área de trabajo, la Cronopsicología.

Perspectivas Futuras

Si siempre es difícil especular acerca de cuál será la evolución de una determinada ciencia, ésto es aún más cierto en el caso de una ciencia de reciente aparición como es el de la Cronobiología. No obstante hay varias líneas de trabajo especialmente interesantes.

El estudio de la fisiología de los "relojes biológicos", así como la elaboración de mapas de fases cada vez más completos de los ritmos que presenta cada especie animal han de ayudar al desarrollo de cualquier tipo de investigación biológica al proporcionar adecuados valores de referencia con fines experimentales o de diagnóstico médico.

El estudio de los ritmos de toxicidad y de efectos terapéuticos de un fármaco permitirá su utilización de una forma más racional para aumentar sus efectos terapéuticos sin que lo hagan paralelamente sus efectos tóxicos. Sin duda, áreas como la cardiología, alergología, inmunología y oncología se verán especialmente afectadas por la Cronobiología.

El desarrollo de nuevos aparatos automáticos que permitan la dosificación modulada a lo largo del tiempo de los medicamentos permitirá la aplicación práctica de los conocimientos aportados por la Cronofarmacología.

La toma en consideración de los ritmos de rendimiento humano deberá permitir el replanteamiento de los ritmos de trabajo a turnos, de la docencia en las escuelas, así como la mejora del rendimiento deportivo.

El diagnóstico precoz, mediante el análisis de las alteraciones que tiene lugar en determinados ritmos marcadores con anterioridad o al comienzo de una determinada patología, permitirá ganar el tiempo suficiente para su tratamiento con éxito.

En definitiva nos encontramos ante una ciencia muy joven que en los próximos años, superada la resistencia actual, deberá ir cobrando cada vez más un peso específico mayor entre el resto de las ciencias biológicas y en especial entre las ciencias biomédicas.

BIBLIOGRAFIA

- Aschoff, J. & Wever, R. (1981). *The circadian system of man*. En: Aschoff, J. (ed). *Handbook of Behavioural Neurobiology*, vol 4, Biological Rhythms. Plenum Press, New York . pp. 311-348.
- Baudoin, C. (1989). *La prise en compte du facteur temps dans les etudes comportementales: presentation de quelques biais experimentaux*. *Sci. Tech. Anim. Lab.* 14: 97-101.
- Brady, J. (1982). *Biological timekeeping*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Bruguerolle, B. (1984). *Chronopharmacologie*. Ellipses. Paris.
- Bunning, E. (1973). *The physiological clock-Circadian rhythms and Biological Chronometry*. Springer-Verlag. Berlín.
- Dreifuss, F.E. and Meinardy, H. (1990). *Chronopharmacology in therapy of the epilepsies*. Raven Press. Nueva York.
- Edmunds, T. N. (1988). *Cellular and molecular bases of biological clocks*. Springer-Verlag. New York.
- Everet, D. & Clark, S. (1985). *Photoperiodism, melatonin and the pineal*. Pitman. Londres.
- Goldbeter, A. (1990). *Rythmes et chaos dans les systemes biochimiques et cellulaires*. Masson. París.
- Halberg, F. (1969). *Chronobiology*. *Ann. Rev. Physiol.*(81): 675-725.
- Hardeland, R., Hohmann, D. & Rensing, L. (1973). *The rhythmic organization of rodent liver. A review*. *J. Interdiscipl. Cycle Res.* (4): 89-118.
- Haus, E. & Kabat, H. (1984). *Chronobiology 1982-1983*. Karger. Basilea.
- Hekken, J.M., Kerkhof, G.A. & Rietveld, W.J. (1988). *Trends in Chronobiology*. Pergamon Press, Oxford.
- Kimura, F. & Tsai, CH. (1984). *Ultradian rhythm of growth hormone secretion and sleep in the adult male rat*. *J. Physiol.* 353: 305-3 15.
- Konopka, R.J. (1987). *Genetics of biological rhythms in Drosophila*. *Ann. Rev. Genet.* 21: 227-236.
- Levi, F. (1987). *Chronobiologie et cancer*. *Pathol. Biol.* (35): 960-968.
- Moore-Ede, M.C., Sulzman, F.M. & Fuller, Ch.A. (1982). *The clocks that time us*. Harvard University Press. Londres.
- Morgan, E. (1990). *Chronobiology and Chronomedicine basic research and applications*. Peter Lang. Frankfurt.
- Pauly, J.E. & Scheving, L.E. (1987). *Advances in Chronobiology (part A and B)*. Alan P. Liss. Nueva York.
- Reinberg, A. (1974). *Des rythmes biologiques a la chronobiologie*. Gautier-Villars. París.
- Reinberg, A. (1989). *Les pieges poses par la structure temporelle en experimentation animale*. *Sci. Tech. Anim. Lab.* (14): 89-95.
- Reinberg, A. & Smolensky, M. (1983). *Biological rhythms and medicine*. Springer Verlag. Nueva York.
- Reppert, S.M. (1989). *Development of circadian rhythmicity and photoperiodism in mammals*. Perinatology Press. Nueva York.
- Sanvisens, A. (1989). In: *Ritmos y relojes biológicos*. PPU. Barcelona.
- Schulz, H. & Lavie, P. (1985). *Ultradian rhythms in physiology and behavior*. Springer-Verlag. Berlín.
- Turek F W. (1985). *Circadian neural rhythms in mammals*. *Ann. Rev. Physiol.* (47): 49-64.

Madrid, J.A.