



**universidad
de león**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**CRONOBIOLOGÍA Y RITMOS CIRCADIANOS EN
EL SISTEMA HEMATOLÓGICO**

**CHRONOBIOLOGY AND CIRCADIAN RHYTHM IN
THE HEMATOLOGIC SYSTEM**

Autor: Raquel Gómez Rilova

Tutora: María José Cano Rábano

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Julio, 2022

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cronobiología y su historia	1
1.2. Ritmos biológicos	1
1.3. Los ritmos circadianos	4
1.3.1. El reloj molecular	5
1.3.2. Melatonina	6
1.3.3. Zeitgebers o sincronizadores	7
1.3.3.1. Luz	8
1.3.3.2. Melatonina exógena	9
1.3.3.3. Ejercicio físico	9
1.3.3.4. Alimentación	10
2. OBJETIVOS	10
3. METODOLOGÍA	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4.1. Propiedades circadianas del sistema hematológico	11
4.1.1. Propiedades circadianas de los eritrocitos	11
4.1.2. Propiedades circadianas de los leucocitos	13
4.1.2.1. Eosinófilos	13
4.1.2.2. Basófilos	14
4.1.2.3. Linfocitos	15
4.1.3. Propiedades circadianas de los trombocitos	17
4.2. Cronodisrupción	18
4.2.1. Trabajo a turnos nocturno	18
4.2.2. Ritmos hematológicos y cáncer	19
5. CONCLUSIONES	20
6. REFERENCIAS	20

RESUMEN

Todos los seres vivos, desde las eubacterias hasta el ser humano, tienen la capacidad de anticiparse y adaptarse a los cambios periódicos del medioambiente debido a la existencia de los ritmos circadianos endógenos. Estos ritmos han sido bien estudiados en el cerebro y en varios tejidos periféricos, pero hasta hace poco no se habían caracterizado los ritmos circadianos en el sistema hematológico. Tras realizar una revisión sobre los conceptos básicos de la cronobiología como antecedente, el objetivo de este trabajo es el estudio de las propiedades rítmicas de las diferentes células sanguíneas y los mecanismos por los cuales se generan los ritmos circadianos, y estudiar la relación existente entre la cronodisrupción de los ritmos circadianos hematológicos con el trabajo a turnos nocturnos y el desarrollo de cáncer. Por todo ello, resulta imprescindible conocer los patrones de los ritmos circadianos de los parámetros sanguíneos y tenerlo en cuenta para realizar siempre las extracciones de muestras de sangre a la misma hora y así evitar variaciones en los resultados de los estudios. También supondría una ventaja para mejorar el tratamiento con distintos fármacos ya que nos permitirá conocer el momento en el que estas sustancias son más efectivas.

Palabras clave: cronobiología, genes reloj, hematología, ritmo circadiano, sincronizadores, trabajo a turnos.

ABSTRACT

All living beings, from eubacteria to humans, have the ability to anticipate and adapt to periodic changes in the environment due to the existence of endogenous circadian rhythms. These rhythms have been well studied in the brain and various peripheral tissues, but circadian rhythms in the hematological system had not been characterized until recently. After reviewing the basic concepts of chronobiology as background, the objective of this work is to study the rhythmic properties of different blood cells and the mechanisms by which circadian rhythms are generated, and to study the relationship between the chronodisruption of hematological circadian rhythms with shift work and the development of cancer. For all these reasons, it is essential to know the patterns of the circadian rhythms of blood parameters and to take this into account in order to always draw blood samples at the same time and thus avoid variations in the results of the studies. It would also be an advantage to improve treatment with different drugs since it will allow us to know the moment in which these substances are most effective.

Key words: chronobiology, circadian rhythms, clock genes, hematology, shift work, synchronizers.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cronobiología y su historia

Una de las características fundamentales de los seres vivos es la existencia de ritmos biológicos en las manifestaciones vitales. Las primeras evidencias de la existencia de los ritmos biológicos fueron presentadas en 1729 por el astrónomo francés Jean-Jacques De Mairan, que estudió de los movimientos de las hojas de la planta *Mimosa pudica*. Este observó los movimientos de apertura durante el día y cierre durante la noche de las hojas de esta planta. Para comprobar si estos movimientos se realizaban en respuesta a la luz metió la planta en un armario aislándola del ciclo de luz y oscuridad. De esta forma demostró que los movimientos rítmicos se mantenían en condiciones de oscuridad constante realizando un ciclo de cerca de 24 horas, y concluyó en la existencia de un reloj interno o mecanismo endógeno que regulaba los movimientos de la planta incluso en ausencia de estímulos externos (de Mairan, 1729).

Desde entonces se han llevado a cabo una gran amplitud de estudios en una gran variedad de especies, desde bacterias al ser humano en los que se ha demostrado el origen endógeno de los ritmos. Para comprobarlo se mantiene al organismo a estudiar en condiciones ambientales constantes, como luz y temperatura, en las que adopta un período de libre curso que difiere de las 24 horas, ya que se encuentra en ausencia de las señales ambientales para sincronizarse.

A partir de estos estudios de los ritmos biológicos surge en 1960 una nueva disciplina científica denominada Cronobiología (de *kronos* = tiempo, *bios* = vida y *logos* = estudio), que es la ciencia encargada del estudio de los fenómenos biológicos que se expresan con un patrón rítmico. La sincronización de estos ritmos biológicos resulta fundamental para el correcto funcionamiento de todos los organismos vivos, hasta el punto en que, si estos desaparecieran, podría conducir a serios problemas o incluso la muerte.

1.2. Ritmos biológicos

Se conoce como ritmo biológico la variación periódica y previsible de una variable de un organismo (Aschoff, 1981). Los ritmos biológicos, lo mismo que cualquier fenómeno que se repite continuamente, pueden estudiarse como una onda sinusoidal, de forma similar al análisis de los sistemas físicos (Caba y Valdez, 2015). La descripción de un ritmo mediante una función sinusoidal permite su caracterización y cuantificación por la estimación de varios parámetros (Madrid, 1991).

Los distintos parámetros que definen un ritmo biológico son los siguientes (Kuhlman *et al.*, 2018):

- El **periodo** (τ) es la duración del ritmo, es decir, el intervalo de tiempo entre dos puntos idénticos del fenómeno que se está estudiando y se mide en unidades de tiempo.
- La **frecuencia** es la inversa del periodo ($1/\tau$).
- El **valor medio** o **mesor** (M) corresponde con la media aritmética de todos los valores obtenidos dentro de un ciclo.
- La **amplitud** (A) es la diferencia entre el valor máximo (o mínimo) y el valor medio obtenido para el ciclo completo.
- La **fase** (F) es el valor de una variable en un momento determinado del ciclo. Para su caracterización normalmente se determina la acrofase que es el momento en el que la variable alcanza su valor máximo. Por otro lado, la batifase es el momento del ciclo en el que la variable alcanza su valor mínimo. Se dice que dos ritmos están en fase cuando tienen el mismo periodo y las variables evolucionan de manera sincrónica. Cuando las acrofases ocurren en tiempos diferentes, se dice que están fuera de fase, pudiendo haber entonces adelanto o retraso de fase.

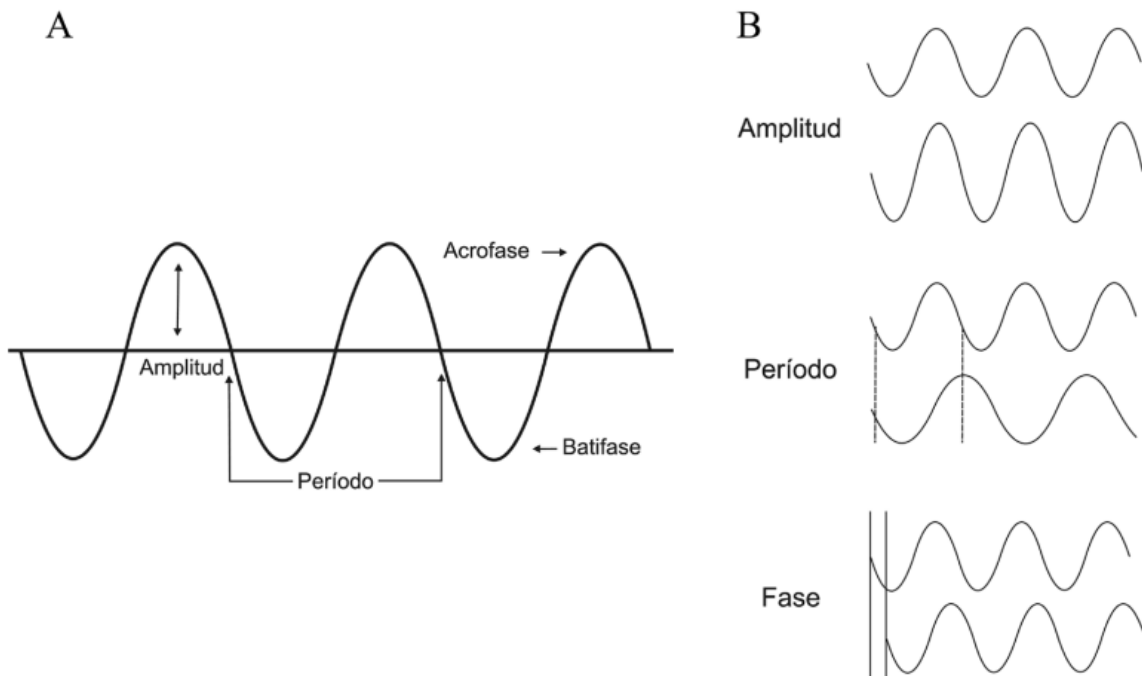


Figura 1. Representación gráfica de los parámetros que caracterizan los ritmos biológicos ajustados a una función periódica (Caba y Valdez, 2015)

La representación de las acrofases de los distintos ritmos de un organismo se denomina mapa de fases e indica la relación de orden temporal entre los distintos procesos fisiológicos, en el que aparece una secuencia característica.

Los ritmos biológicos se clasifican según la duración de su periodo en circadianos, infradianos y ultradianos. Los ritmos circadianos son aquellos cuyo periodo está próximo a 24 horas, tienen una frecuencia de un ciclo por día, y son los ciclos más estudiados y mejor comprendidos. Los ritmos infradianos tienen un periodo mayor a 28 horas. A su vez, estos se dividen en una gran variedad de ritmos: circaseptidianos (aprox. 7 días), circamensuales (aprox. 28 días) o circanuales (aprox. 365 días). Por último, los ritmos ultradianos son aquellos cuyo período es menor a 20 horas, es decir, una frecuencia mayor de un ciclo por día (Madrid, 1991; Caba y Valdez, 2015).

Tabla 1. Clasificación de los ritmos biológicos en función de su periodo y ejemplos de cada tipo.

<i>Tipo de ritmo</i>	<i>Periodo</i>	<i>Ejemplo</i>
Ultradiano	0,1 s	Electroencefalograma
	6 s	Ritmo respiratorio
	90 min	Etapas del sueño
Circadiano		Sueño-vigilia
		Temperatura corporal
		Procesos metabólicos
	24 h	Secreciones hormonales
		Actividad-descanso
Infradiano	28 d	Menstruación
	365 d	Hibernación
	365 d	Migración

Los relojes biológicos proporcionan una ventaja adaptativa al garantizar que los procesos bioquímicos y fisiológicos internos de un organismo, además del comportamiento, se adapten de manera óptima al entorno local (Kuhlman *et al.*, 2018). Permite al organismo una regulación anticipatoria y un ahorro de energía al sincronizarse con el medio externo. Esto es lo que se conoce como homeostasis predictiva, que permite al organismo anticipar mecanismos que predicen cambios que ocurrirán más tarde, y de esta forma facilitar la adaptación del organismo ante ellos. Se produce una respuesta antes de que aparezca el estímulo (Riede *et al.*, 2017). En conclusión, los ritmos biológicos se encargan de proporcionar un marco de estabilidad temporal a los seres vivos.

1.3. Los ritmos circadianos

Los ritmos biológicos dependen de relojes internos, situados en distintas estructuras dependiendo de la especie considerada. Son estos relojes los que generan nuestros ritmos circadianos y los ajustan a un periodo de 24 horas a partir de señales que reciben del medioambiente, fundamentalmente de la luz (Sánchez Barceló, 2021). Es decir, los ritmos circadianos están sincronizados por factores externos, pero no están determinados por ellos. (Arteaga, 1993).

Las propiedades que poseen los ritmos circadianos fueron definidas por Colin Pittendrigh (Pittendrigh, 1960):

- Tienen carácter endógeno y son oscilaciones auto-sostenidas, ya que persisten en ausencia de señales externas, manteniendo un periodo cercano a 24 horas. Este periodo endógeno varía entre las distintas especies.
- Capacidad de sincronización por periodicidades ambientales denominadas sincronizadores o *zeitgebers* (dador de tiempo), como el ciclo de luz-oscuridad.
- Son innatos y se encuentran en todos los niveles de organización del organismo.
- Presentan compensación térmica, es decir, el periodo es estable ante cambios de temperatura dentro del rango fisiológico.

El sistema circadiano en mamíferos está formado principalmente por un oscilador central, sus conexiones aferentes, que forman las vías de sincronización con el ambiente, y sus conexiones eferentes, que transmiten la hora del día estimada por el oscilador central al organismo (Caba y Valdez, 2015). El oscilador central o reloj central del sistema circadiano se localiza en una región del hipotálamo denominada núcleo supraquiasmático (NSQ) (Moore, 1991).

Los cambios periódicos de luz/oscuridad son los encargados de reajustar el NSQ, aunque existen otros sincronizadores externos, como el ciclo de ingesta/ayuno y el de actividad/reposo, que influyen principalmente en otros relojes que se encuentran en otros órganos de nuestro cuerpo (Reppert y Weaver, 2002). Estos relojes que están presentes en otras partes del cerebro y en otros tejidos/órganos, y se denominan relojes periféricos. El reloj central sincroniza los relojes periféricos a través de vías que involucran señales nerviosas y hormonales (Smolensky y Peppas, 2007).

La evidencia para demostrar que el NSQ es el principal oscilador circadiano en mamíferos se basa en estudios en roedores, en los que se observó que la ablación o lesión del NSQ provoca la pérdida de los ritmos endógenos de 24 horas, mientras que el trasplante de esta estructura podía revertir este efecto y restablecer los ritmos circadianos en animales con lesión del NSQ (Meyer-Bernstein *et al.*, 1999).

1.3.1. El reloj molecular

El reloj circadiano está programado genéticamente, y los genes reloj que constituyen el oscilador se han identificado principalmente mediante el uso de organismos modelo como cianobacterias, *Neurospora sp.*, *Drosophila melanogaster* y ratones (Dunlap, 1999). Muchos de estos genes reloj forman un bucle de retroalimentación negativa basado en la transcripción/traducción, jugando un papel fundamental en la generación de los ritmos circadianos a nivel intracelular, mecanismo que se conoce como “reloj molecular” (Orozco-Solis y Sassone-Corsi, 2014).

Los principales genes reloj de la maquinaria circadiana son los genes *CLOCK* (*Circadian locomotor output cycles kaput*) y *BMAL-1* (*Brain and muscle ARNT-like1*). Durante la noche, los productos de estos genes forman un heterodímero que funciona como un factor de transcripción que mediante su unión a la región promotora de la E-box, activan la expresión de los genes reloj *Per*, *Cry* y *Rev-erb- α* . A su vez, las proteínas PER y CRY dimerizan y actúan en el núcleo como reguladores negativos del ciclo ya que inhiben la transcripción dependiente de CLOCK-BMAL-1, resultando así en la inhibición de su propia transcripción. Al final del día, el complejo represor PER-CRY es degradado por una caseinkinasa, permitiendo la expresión de CLOCK-BMAL-1 y el inicio de un nuevo ciclo de transcripción (Hirota y Fukada, 2004) . Esta red oscilatoria compleja sostiene oscilaciones transcripcionales de 24 horas y sincroniza la transcripción de los genes reloj con cambios en los ciclos de luz-oscuridad. Además del ciclo de retroalimentación primario, hay un segundo ciclo de retroalimentación negativa que involucra a los receptores nucleares ROR α y REV-ERB α . Estos compiten por unirse al promotor de *BMAL1*, donde ROR α activa la transcripción de *BMAL1* mientras que REV-ERB α la inhibe. Así, cuando el complejo PER-CRY inhibe a CLOCK-BMAL-1 también disminuye la expresión de *Rev-erb- α* , lo que permite de nuevo la transcripción de *BMAL-1* y *CLOCK* asegurando que el ciclo se repita de forma indefinida (Takahashi *et al.*, 2008; Liu y Chu, 2012).

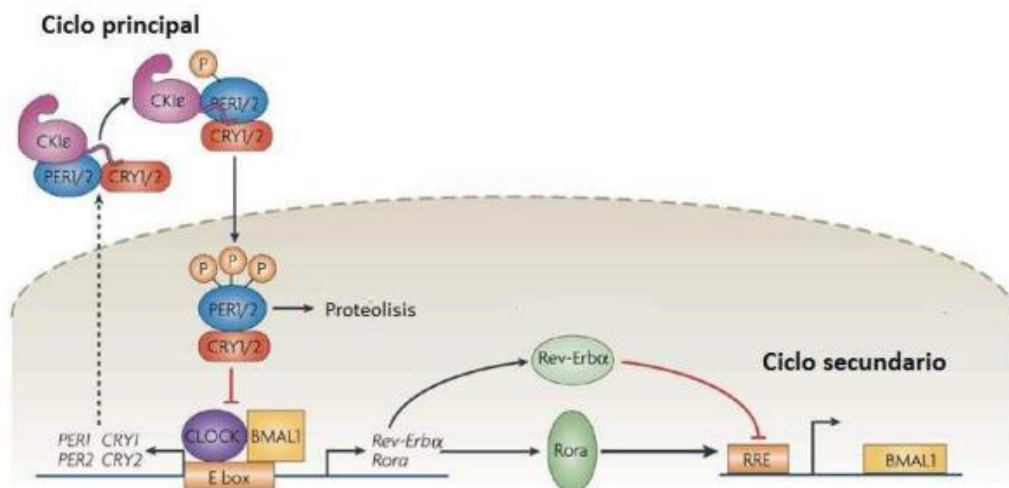


Figura 2. Reloj molecular en mamíferos. *CLOCK* y *BMAL1* promueven la expresión de las proteínas dimericas *PER* y *CRY*. A lo largo del día *PER* y *CRY* se acumulan y dimerizan, y tras ser fosforiladas se traslocan al núcleo donde interactúan y reprimen la actividad del complejo *CLOCK/BMAL1* que es su propio activador. Durante la noche, *PER* y *CRY* son degradados por proteólisis permitiendo repetir el ciclo. También existe un ciclo secundario formado por el activador *Rora* y el inhibidor *Rev-Erba* que controlan la expresión de *BMAL1*. (Gallego y Virshup, 2007).

1.3.2. Melatonina

La melatonina es una hormona producida en la glándula pineal, bajo un estricto control del marcapasos circadiano central en el NSQ (Borjigin *et al.*, 2012). Participa activamente en la regulación del reloj circadiano, y su principal función es transmitir información sobre el ciclo de luz y oscuridad diario a los distintos tejidos. La melatonina actúa a la vez como mensajero hormonal del NSQ y regulador de la actividad de este núcleo, ya que su ritmo endógeno puede indicar la fase u hora del reloj biológico (Arendt, 2000).

La síntesis de melatonina en la glándula pineal se produce de manera circadiana, de manera que los niveles de melatonina circulantes son característicamente bajos en presencia de luz y aumentan durante la noche, momento durante el cual induce el sueño. Dado que la melatonina no se almacena en la glándula pineal, las concentraciones en sangre reflejan estrechamente tanto la tasa de síntesis como el patrón de secreción. (Gamble *et al.*, 2014).

La percepción de la luz por la retina estimula los fotorreceptores en bastones, conos y células ganglionares de la retina. En concreto, las células ganglionares de la retina expresan el fotopigmento melanopsina y convierten las señales de luz en señales eléctricas que transmiten al NSQ a través de los tractos retinohipotalámicos, y transmiten información al oscilador central acerca de la presencia o ausencia de luz, y el nivel de iluminación (Do y Yau, 2010; Münch y

Bromundt, 2012). A su vez, el NSQ conecta con la glándula pineal a través de núcleo paraventricular hipotalámico. De esta forma, la glándula pineal libera melatonina a partir de las señales nerviosas transmitidas por el NSQ.

Los efectos de la melatonina están ligados a su unión con receptores de membrana de alta afinidad. En mamíferos, se han identificado tres tipos de receptores de melatonina: MT1, MT2 y MT3 (Dubocovich *et al.*, 2003). MT1 y MT2, son receptores de membrana acoplados a proteína G y su activación produce la inhibición de la adenilato ciclasa, disminuyendo el AMPc intracelular, o la activación de la vía de la fosfolipasa C; según el tipo de proteína G active. El receptor de melatonina MT3 es en realidad la enzima citosólica quinona reductasa II (Slominski *et al.*, 2012). Mediante la activación de estos receptores la melatonina será capaz de controlar diferentes procesos fisiológicos y neuroendocrinos. En el cerebro, los receptores MT1 se encuentran en el hipotálamo, incluyendo el NSQ. Los receptores MT2 se encuentran en la retina, el hipocampo, NSQ y cerebelo. Estos receptores también se encuentran en varios tejidos periféricos. Debido a la presencia de receptores de melatonina en el NSQ, estos proporcionan un bucle de retroalimentación mediante el cual la melatonina circulante puede influir en el marcapasos circadiano a la vez que controla el momento de secreción de melatonina (Sack *et al.*, 2009).

1.3.3. Zeitgebers o sincronizadores

La persistencia de los ritmos circadianos en condiciones ambientales constantes no implica que esos ritmos sean independientes de las variaciones ambientales, ya que algunos cambios ambientales modulan el período de estos ritmos (Pittendrigh, 1960). Las señales externas del medio ambiente capaces de modular el período o la fase de los ritmos circadianos son los sincronizadores o *Zeitgebers*. El principal agente sincronizador de estos ritmos es el ciclo de iluminación, aunque existen otros como el ciclo de temperatura ambiental, el ciclo de alimentación y el ciclo de estimulación social, que también participan en el proceso y se conocen como sincronizadores secundarios.

Sin embargo, los cambios inducidos en el período o la fase de los ritmos circadianos debido a la influencia de los sincronizadores, en especial por la presencia o ausencia de luz no ocurren de manera inmediata, sino que la actividad va cambiando de manera gradual hasta acoplarse a

las nuevas variables ambientales. En condiciones normales, el proceso por el cual un ritmo circadiano se sincroniza con un ciclo externo se denomina arrastre.

1.3.3.1. Luz

La luz es el agente de sincronización más fuerte para el sistema circadiano y, por lo tanto, mantiene la mayoría de los ritmos biológicos sincronizados internamente, para un funcionamiento óptimo (Benstaali *et al.*, 2001). El tiempo necesario para que ocurra un ciclo de una oscilación circadiana en condiciones constantes se conoce como período de funcionamiento libre (FRP). Así, en condiciones de oscuridad constantes el periodo de los ritmos se desvía de las 24 horas.

Los organismos diurnos muestran un FRP ligeramente más corto en condiciones de luz continua que en continua ausencia de luz; mientras que los organismos nocturnos muestran un FRP más largo, es decir, un reloj más lento en condiciones de luz continua que en condiciones de oscuridad continua (Benstaali *et al.*, 2001; Meijer, 2001). Este fenómeno, descrito se conoce como “Regla de Aschoff”. Esto es debido a que cuando los animales se mantienen en oscuridad continua, el sistema circadiano es muy sensible a los pulsos de luz, más que a los pulsos de oscuridad cuando está en condiciones de luz continua (Carpenter y Grossberg, 1984).

El cambio de fase de un ritmo producido por un pulso de luz dependerá de sus características. Diferentes estudios han demostrado que la luz de longitud de onda más corta (azul y verde) es más eficaz para el cambio de fase del ritmo de melatonina que la longitud de onda más larga (roja) (Brainard *et al.*, 1988). En relación a la duración de la exposición a la luz, cuando se combinaron diferentes intensidades y duraciones de luz, las exposiciones más largas con una intensidad de luz moderada dieron como resultado cambios de fase más grandes que las exposiciones más cortas a una luz más brillante. Por lo que, a mayor duración del pulso, mayor desplazamiento de fase (Dawson *et al.*, 1993). El momento en el que se da el estímulo de luz también afecta a la magnitud del desplazamiento de fase. Para conseguir un retraso de fase del ritmo circadiano más fuerte, la exposición a la luz se produjo en las horas de la tarde o al inicio de la noche y para lograr un avance de fase máximo, el estímulo debe ser presentado al final de la noche o en las primeras horas de la mañana después del mínimo de temperatura corporal (Lewy y Sack, 1989). Por último, el impacto de la intensidad de la luz en la fase circadiana deberá superar un umbral, a partir de ese umbral, a mayor intensidad mayor desplazamiento de

fase. En animales nocturnos una intensidad de 200 lux es suficiente para que se produzca un desplazamiento de fase (Meijer, 2001).

1.3.3.2. Melatonina exógena

La melatonina exógena es un sincronizador si se administra en el momento adecuado, pudiendo avanzar y retrasar la fase del sistema circadiano. Se ha demostrado que, si se administra melatonina por la tarde o al anochecer, se produce un avance de fase en el ritmo de la melatonina, en oposición al retraso de fase que se observa tras la exposición a luz brillante por la tarde. Por otro lado, se ha demostrado un retraso de fase con la administración de melatonina en la mañana, alrededor del momento en que la melatonina endógena cesa de segregarse (2 h antes de la hora habitual de despertarse) (Revell y Eastman, 2005).

La melatonina exógena puede cambiar la fase de los ritmos circadianos, y por lo tanto puede ser utilizada como tratamiento para atenuar el grado de desalineación circadiana y los efectos negativos para la salud provocados por el trabajo a turnos nocturnos o rotatorios, estudio durante horarios nocturnos, desfase horario y el jet lag (vuelos de larga distancia, cruzando varias zonas horarias) (Crowley y Eastman, 2015).

1.3.3.3. Ejercicio físico

La actividad física está vinculada también con el proceso de sincronización no lumínica del sistema circadiano. Este efecto de sincronización varía según el momento en el que se realice el ejercicio, por lo que un horario inadecuado de actividad puede provocar efectos negativos en la salud del individuo (Rubio-Sastre *et al.*, 2014). Se ha demostrado que realizar ejercicio intenso durante la noche produce un retraso de fase del ritmo circadiano interno, mientras que realizar ejercicio por la mañana o al principio de la tarde produce un avance de fase. Debido a esto, el ejercicio, si se realiza en el momento adecuado del día, podría cambiar la fase del ritmo circadiano interno y, por lo tanto, mejorar la desalineación circadiana. (Thomas *et al.*, 2020)

1.3.3.4. Alimentación

Diferentes estudios han demostrado que los patrones de alimentación actúan como sincronizadores de osciladores circadianos periféricos (hígado, riñón, páncreas y corazón), pero no afectan al oscilador central, de manera que los ciclos de alimentación y ayuno intervienen en la expresión de los genes circadianos en estos tejidos (Damiola *et al.*, 2000). Por esto, aunque no se comprende bien los mecanismos de arrastre de fase en el sistema circadiano, mantener un horario regular de ingesta de alimentos constituye un factor fundamental para una mejor utilización metabólica y estabilidad del peso corporal (Tahara y Shibata, 2013).

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo han sido:

Objetivo general: Evaluar la literatura disponible sobre la cronobiología y los ritmos circadianos de las distintas células sanguíneas.

Objetivos específicos:

1. Estudiar las diferentes variables que afectan a las células sanguíneas y los mecanismos de sus ritmos circadianos a nivel molecular con el fin de determinar en qué momento presentan su máxima capacidad de actuación.
2. Describir los diferentes mecanismos por los que se puede producir una alteración de los ritmos circadianos de las células sanguíneas
3. Describir la relación existente entre el desarrollo de cáncer y la desincronización de los ritmos circadianos y comprender la importancia de estos para su tratamiento.

3. METODOLOGÍA

Para dar respuesta a la investigación y a los objetivos descritos, se ha realizado una revisión de la literatura existente.

Como gestor bibliográfico se ha utilizado Mendeley Desktop, citando la bibliografía según el método Harvard_Ule.

Las palabras clave utilizadas en la búsqueda se ha realizado en dos idiomas:

- ESPAÑOL: cronobiología, ritmo circadiano, genes reloj, hematología, cáncer, trabajo por turnos.
- INGLÉS: chronobiology, circadian rhythms, clock genes, hematology, cancer, shift work.

Estos términos se han obtenido de diversas bases de datos y fuentes en las cuales se ha realizado la búsqueda bibliográfica: PubMed, Google Académico, Science Direct, Nature, Research Gate, Blood, Sage Journals, etc.

Dada la escasa bibliografía que existe al respecto, no se ha aplicado ningún filtro en cuanto a años de la publicación, idioma o especie objeto de estudio para no limitar los resultados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Propiedades circadianas del sistema hematológico

Los ritmos circadianos han sido bien caracterizados en el cerebro y en varios tejidos periféricos, pero hasta hace poco se había prestado relativamente poca atención a los ritmos circadianos en el sistema hematológico.

El número de células sanguíneas circulantes en la sangre periférica muestra ritmos circadianos muy regulares y altamente reproducibles (Haus *et al.*, 1983). Sin embargo, la naturaleza compleja de esta regulación ha impedido la explicación de los mecanismos subyacentes de los cambios circadianos en las células sanguíneas circulantes (Haus y Smolensky, 1999).

A continuación, se van a describir las propiedades rítmicas de los eritrocitos, leucocitos y trombocitos, y explicaremos cómo estas propiedades podrían afectar a los resultados de diferentes estudios.

4.1.1. Propiedades circadianas de los eritrocitos

Los eritrocitos son el tipo celular más abundante entre las células sanguíneas circulantes y representan aproximadamente el 25 % de todas las células del cuerpo humano (Waugh y Grant, 2010). Transportan oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos, donde se utiliza para la respiración aeróbica, generando energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP). Para

cumplir esta función, el citoplasma de los eritrocitos contiene hemoglobina, una proteína transportadora de oxígeno que contiene hierro. Para albergar la mayor cantidad posible de hemoglobina en el citoplasma, los eritrocitos carecen de núcleo y otros orgánulos. (Waugh y Grant, 2010)

Se cree que los ritmos circadianos están impulsados por bucles de retroalimentación de transcripción-traducción, mediante los cuales la expresión rítmica de los productos de los genes reloj regula la expresión de los genes asociados en un ciclo de aproximadamente 24 horas. Sin embargo, los glóbulos rojos, que no contienen núcleo, por lo que no pueden realizar la transcripción, exhiben ritmos redox circadianos.

Las peroxirredoxinas (PRX) son una familia de enzimas antioxidantes muy conservada que ayudan a controlar los niveles de peróxido intracelular (Hall *et al.*, 2009). Las PRX contienen en el centro catalítico un residuo cisteína que es oxidado por sustrato a ácido sulfínico. Las enzimas 2-Cys PRX, son un subgrupo de la familia PRX, susceptibles a la hiperoxidación que da como resultado su inactivación (Rhee *et al.*, 2007).

Se han realizado estudios en eritrocitos humanos cultivados en condiciones constantes de luz y temperatura y se han observado fuertes oscilaciones estadísticamente significativas en los niveles de PRX oxidadas con un período alrededor de 24 horas. Debido a que la oscilación de la modificación postraduccional de las PRX se mantenía en condiciones de funcionamiento libre, esto refleja un ritmo endógeno circadiano. De esta manera se comprobó la persistencia de los ritmos circadianos en los glóbulos rojos sin transcripción activa (O'Neill y Reddy, 2011).

Por último, es importante señalar que la cantidad de eritrocitos circulantes en la sangre está regulada por el reloj circadiano endógeno. La acrofase del ritmo de los glóbulos rojos circulantes está cerca del momento de la transición de luz a oscuridad tanto en ratones como en humanos (Haus *et al.*, 1983). El número de glóbulos rojos circulantes está determinado tanto por su eliminación de la circulación periférica en el bazo y el hígado, como también por su producción en la médula ósea. (Oishi *et al.*, 2006). Los reticulocitos circulantes tienen un ritmo circadiano, lo que sugiere su liberación periódica circadiana de la médula ósea (Haus *et al.*, 1983). Por otro lado, la mutación del gen *CLOCK* en ratones no afectó al ritmo circadiano de los glóbulos rojos, y esto se debe a que se produjo una mayor eliminación de glóbulos rojos del torrente sanguíneo y/o una disfunción en la descarga de glóbulos rojos del bazo (Oishi *et al.*, 2006).

4.1.2. Propiedades circadianas de los leucocitos

Los leucocitos representan alrededor del 1 % del volumen total de sangre y están implicados en la respuesta del sistema inmunitario innato y adaptativo. Son un grupo de células estrechamente relacionadas entre sí, que incluyen linfocitos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos, que difieren en su abundancia, estructura y función (Carrick y Begg, 2008). Al igual que en el caso de los eritrocitos, el número de glóbulos blancos circulantes involucrados en la defensa inmune está sujeto a ritmos circadianos de gran amplitud (Brown y Dougherty, 1956). Este parámetro depende de los componentes centrales del reloj circadiano, ya que la acrofase del ritmo se amortigua y se retrasa en ratones mutantes *CLOCK* (Oishi *et al.*, 2006).

Se ha comprobado en varios estudios la presencia de una transcripción cíclica y significativa de genes reloj en leucocitos circulantes en sangre periférica, que están presentes en leucocitos cultivados en condiciones constantes, lo que respalda su naturaleza endógena (Boivin *et al.*, 2003; Labrecque y Cermakian, 2015).

También, debido a la relativa facilidad de cuantificar la expresión de los genes reloj en los leucocitos, podría proporcionar un medio sencillo y no invasivo para evaluar la función del sistema circadiano y comprender la fisiopatología de los trastornos de los ritmos circadianos (Fukuya *et al.*, 2007).

4.1.2.1. Eosinófilos

Los eosinófilos normalmente solo comprenden del 1 % al 3 % de la población total de leucocitos en sangre periférica y son especialmente importantes en la defensa ante infecciones por parásitos externos como los helmintos (Carrick y Begg, 2008). También modulan las respuestas inflamatorias alérgicas a través de la liberación de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, mediadores lipídicos y proteínas básicas almacenadas en gránulos, incluida la proteína básica principal, la peroxidasa de eosinófilo, la proteína catiónica eosinofílica (ECP) y la proteína X del eosinófilo o neurotoxina derivada del eosinófilo (EPX/EDN) (Stone *et al.*, 2010).

Al igual que otras células sanguíneas, el número de eosinófilos en sangre presenta una variación diaria en adultos sanos (Haus y Smolensky, 1999), aunque aún no se conoce el mecanismo causal. Además ha sido demostrado que los síntomas de las enfermedades alérgicas, como la

rinitis alérgica, se intensifican entre la medianoche y las primeras horas de la mañana, lo que sugiere un papel del reloj biológico (Smolensky *et al.*, 2007). Es posible que los eosinófilos contribuyan a esta variación diaria, ya que se han observado oscilaciones circadianas en la expresión de ECP y EPX/EDN en eosinófilos humanos *in vitro* (Baumann *et al.*, 2013). De acuerdo con este hallazgo, un estudio en niños reveló que las concentraciones séricas y urinarias de ECP y EPX/EDN exhiben variaciones circadianas con niveles máximos nocturnos y a primera hora de la mañana (Wolthers y Heuck, 2003). También se han observado estos ritmos diarios en los niveles de ECP de secreciones nasales y en los niveles de EPX/EDN en esputo y orina (Aoyagi *et al.*, 1999; Storm Van's Gravesande *et al.*, 1999; Panzer *et al.*, 2003). Estos hallazgos proporcionan una explicación de la expresión rítmica del ARNm de proteínas específicas de eosinófilos que probablemente estén reguladas por el reloj circadiano. Significativamente, la respuesta inmune de los eosinófilos varía de manera circadiana.

4.1.2.2. Basófilos

Los basófilos son el tipo menos común de leucocito y representan menos del 1 % de la población total. Comparten muchas funciones con los mastocitos residentes en los tejidos y son los responsables del desarrollo de la respuesta de hipersensibilidad debido a la liberación de histamina (Carrick y Begg, 2008) . También secretan heparina, quimiocinas, que atraen eosinófilos y neutrófilos, y citocinas, en especial interleucina-4 (IL-4) que promueve la diferenciación de los linfocitos T helper 2 (Stone *et al.*, 2010). Tanto el número de basófilos circulantes como la liberación de histamina presentan variaciones diarias en humanos (Friedman *et al.*, 1989).

En un estudio en humanos, se determinó si la reactividad basófila específica de alérgeno variaba en función de la hora del día en pacientes con rinitis alérgica y si el reloj circadiano desempeñaba algún papel en la variación de la reactividad de los basófilos. Para ello se examinó la expresión de CD203c (marcador de activación) inducido por alérgenos en basófilos obtenidos a distintas horas en varios pacientes, y se observó un número significativamente mayor de basófilos activados a las 07:00 h que a las 19:00 h. También se descubrió que los basófilos generados a partir de ratones *wildtype* mostraron una variación dependiente de la hora del día en la producción de histamina e IL-4 inducida por inmunoglobulina E, que no se observó en los basófilos generados a partir de ratones *CLOCK* mutantes (Ando *et al.*, 2015). Esto implica que

la respuesta inmunológica rítmica de los basófilos está regulada por los genes reloj y que contribuye a la ritmicidad en los síntomas de las afecciones alérgicas.

4.1.2.3. Linfocitos

Los linfocitos comprenden el segundo grupo más grande de leucocitos en circulación en humanos. Se dividen en dos grupos principales: linfocitos T y B, y son los principales agentes de la inmunidad adaptativa (Carrick y Begg, 2008). La inmunidad adaptativa permite que un organismo responda de una manera específica a los patógenos y otros agentes no propios. Además, después de una primera infección, las células T y B pueden diferenciarse en células de memoria, que permanecen en el organismo durante períodos prolongados, listas para mediar una respuesta inmunitaria fuerte y rápida en el futuro encuentro con el patógeno, incluso años después de la infección inicial.

Aunque la regulación circadiana de las respuestas inmunitarias adaptativas no ha sido muy estudiada, ha ganado mucho interés en los últimos años. Ahora sabemos que muchos aspectos de la inmunidad adaptativa, incluidos el tráfico celular, la diferenciación celular y la respuesta a la presentación de antígenos, están controlados por relojes circadianos (Cermakian *et al.*, 2022).

Como en muchos otros tejidos y tipos de células, los genes del reloj circadiano se expresan en linfocitos T y B, donde controlan la expresión génica y varios procesos celulares. En los ganglios linfáticos de ratón los genes reloj muestran una expresión rítmica, estos órganos linfoides son el sitio de inducción de la respuesta de las células T y B, y están compuestos en gran proporción por estos tipos de células. Este ritmo se atenúa en ganglios linfáticos de ratones mutantes *CLOCK* (Keller *et al.*, 2009; Fortier *et al.*, 2011).

Los linfocitos están en continua circulación entre la sangre, la linfa y los órganos linfoides, para asegurar una vigilancia inmunitaria eficiente en todo el cuerpo. Este tráfico de células T y B está regulado por el control circadiano. Hay una variación pronunciada en los recuentos sanguíneos de linfocitos en sangre durante las 24 horas del día en los mamíferos. En muestras de sangre humana, el número de células T y B generalmente es alto por la noche, disminuye por la mañana y permanece bajo durante el día (Abo *et al.*, 1981; Kirsch *et al.*, 2012).

Esta disminución matinal en el número de linfocitos T circulantes coincide con el aumento matutino del cortisol y una mayor expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 por parte de

las células T (Besedovsky *et al.*, 2014). El bloqueo del aumento matutino del cortisol en humanos mediante la administración de metirapona (principio activo inhibidor de la esteroidogénesis) previene la disminución matutina del número de células T en la sangre e inhibe el aumento matutino de CXCR4 (Besedovsky *et al.*, 2014). Por lo tanto, el ritmo de los recuentos de células T en la sangre está bajo el control de la variación circadiana en la producción de cortisol, que regula la expresión de CXCR4 en las células T.

Aunque el número de linfocitos mostró un ritmo en muestras de sangre humana y de rata, no se observaron variaciones en los subconjuntos de linfocitos B, CD4⁺ y CD8⁺ en los ganglios linfáticos de ratón durante un ciclo de 24 horas en oscuridad constante (Fortier *et al.*, 2011).

4.1.2.4. Neutrófilos

Los neutrófilos son las células nucleadas más comunes en la sangre periférica, normalmente, comprenden del 50 % al 70 % del recuento total de leucocitos. Estos son atraídos rápidamente al sitio de infección o inflamación y actúan mediante fagocitosis, los neutrófilos son la primera línea celular de defensa y un componente clave del sistema inmunitario innato (Carrick y Begg, 2008). La médula ósea mantiene una reserva de neutrófilos lista para ser liberada en condiciones homeostáticas y de estrés. Debido al potencial tóxico de los neutrófilos, su liberación debe estar estrictamente regulada para equilibrar su número en la circulación. Esto se logra mediante la producción diaria masiva (hasta 2×10^{11} células por día en humanos) y la liberación controlada temporalmente en la sangre. Los neutrófilos circulantes finalmente se infiltran en los tejidos después de solo 6 a 10 h en la circulación, lo que los convierte en una de las células de vida más corta de nuestro cuerpo. (Aroca-Crevillén *et al.*, 2020)

Una consecuencia de esta rápida renovación es que el número de neutrófilos muestra fuertes cambios circadianos en la sangre, importante para la homeostasis normal. Se ha demostrado que estas oscilaciones circadianas también afectan al fenotipo de los neutrófilos circulantes a lo largo del día, una propiedad denominada envejecimiento de los neutrófilos. Los neutrófilos liberados de la médula ósea muestran niveles elevados de CXCR2 que se reducen progresivamente durante el día, mientras que el receptor de superficie CXCR4 aumenta antes de su salida natural de la sangre, un proceso denominado depuración. Demostraron que la eliminación de estos neutrófilos envejecidos desencadena una reducción en el número de células del nicho hematopoyético en la médula ósea. Dado que este nicho hematopoyético actúa para retener las células madre hematopoyéticas (HSC) en la médula ósea, dicho ritmo

controlado por neutrófilos podría ser la base de las variaciones diarias mostradas en la liberación de HSC en el torrente sanguíneo. También se demostró que el proceso de envejecimiento de los neutrófilos estaba controlado intrínsecamente en las células por el gen reloj central *Arntl* que codifica *Bmal1* (Casanova-Acebes *et al.*, 2013). *Bmal1* regulaba la expresión de *CXCL2* un ligando *CXCR2* que controlaba el envejecimiento de los neutrófilos de una manera autónoma celular.

4.1.3. Propiedades circadianas de los trombocitos

Las trombocitos o plaquetas son fragmentos de células sanguíneas anucleadas derivadas de fragmentos del citoplasma de megacariocitos que contribuyen fisiológicamente a la hemostasia en los sitios de lesión vascular (van der Meijden y Heemskerk, 2018). Sin embargo, la activación patológica de las plaquetas ocasionalmente desencadena una trombosis oclusiva de los vasos sanguíneos y da como resultado eventos isquémicos, como infarto de miocardio y accidente cerebrovascular, que son las principales causas de muerte a nivel mundial. Estos eventos cardiovasculares muestran ritmicidad circadiana, ocurriendo con mayor frecuencia por la mañana, entre las 06:00 h y las 12:00 h, potencialmente relacionado la actividad plaquetaria con el control del reloj circadiano endógeno (Crnko *et al.*, 2019).

La primera evidencia de este hecho se proporcionó en 1987, con la demostración de los ritmos diarios de agregación plaquetaria en hombres adultos sanos (Tofler *et al.*, 1987). Desde entonces se ha demostrado que múltiples medidas implicadas en la activación plaquetaria muestran una fuerte variación según la hora del día, incluida la agregación plaquetaria y los marcadores de activación plaquetaria [como β -tromboglobulina (β TG), factor plaquetario 4 (PF4), glicoproteína Ib (GPIb), P-selectina y α IIb β 3 activado], que también alcanzan su punto máximo por la mañana (Tofler *et al.*, 1987; Jafri *et al.*, 1992; Scheer *et al.*, 2011).

La agregación plaquetaria está bajo el control de los genes reloj, ya que muestra variación diaria en ratones *wildtype* pero no en ratones mutantes *CLOCK* (Ohkura *et al.*, 2009). También se ha demostrado que el gen *CLOCK* regula la expresión rítmica diaria de la trombopoyetina, que a su vez se encarga del desarrollo de megacariocitos, producción de plaquetas y mantenimiento del número de plaquetas (Tracey *et al.*, 2012). Este mecanismo puede contribuir a la ritmicidad diaria en el número de plaquetas circulantes, que alcanza su punto máximo al final de la tarde en humanos sanos (Scheer *et al.*, 2011).

4.2. Cronodisrupción

La cronodisrupción o interrupción circadiana es el desajuste del orden temporal interno de los ritmos circadianos fisiológicos, bioquímicos y conductuales. La interrupción de los ritmos biológicos da lugar a un desajuste entre el ciclo de sueño/vigilia y el sistema de sincronización circadiano endógeno, lo que puede causar efectos adversos para la salud tanto a corto como a largo plazo (Erren y Reiter, 2009).

En la actualidad, diversas situaciones como el jet-lag, el trabajo a turnos nocturno, la contaminación lumínica o realizar actividades por la noche pueden ser la causa de la cronodisrupción, modificando e incluso invirtiendo los ciclos normales de sueño/vigilia (Davis *et al.*, 2006).

En los últimos años, han aparecido evidencias que indican que la cronodisrupción tiene efectos negativos en la salud humana y ha sido estrechamente relacionada con diversas patologías como cáncer, envejecimiento prematuro, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico y obesidad (Garaulet, 2015).

4.2.1. Trabajo a turnos nocturno

El trabajo por turnos nocturnos causa una interrupción significativa del ritmo circadiano y está asociado con una mayor incidencia de accidentes cerebrovasculares, enfermedades cardíacas y cáncer (Kecklund y Axelsson, 2016). Esto puede explicarse en parte por el impacto negativo de la desregulación circadiana del sistema hematológico. Por ejemplo, roedores sometidos a un desfase horario crónico, la expresión de los genes reloj en células NK y los macrófagos se ve gravemente perturbada, al igual que la expresión rítmica de factores citolíticos y citoquinas en NK (Castanon-Cervantes *et al.*, 2010; Logan *et al.*, 2012). Se suprime la actividad citolítica de las células NK, aumenta el crecimiento del tumor pulmonar y la tasa de mortalidad es mayor después de la exposición a lipopolisacáridos. Estos hallazgos sugieren que la alteración circadiana crónica promueve el crecimiento tumoral al alterar los ritmos circadianos de la función de las células NK (Logan *et al.*, 2012). En hámsteres, la exposición a un horario anormal de luz/oscuridad suprime la variación rítmica en el tráfico de leucocitos circulantes (Prendergast *et al.*, 2013). De manera similar, la cronodisrupción en el pez cebra aumenta la cantidad de eritrocitos envejecidos en la sangre, debido a una reducción en la tasa de apoptosis

de los eritrocitos (Egg *et al.*, 2014). La capacidad de transporte de oxígeno de los eritrocitos envejecidos se reduce y aumenta su tendencia a la agregación, provocando una mayor mortalidad en los animales estudiados. En humanos también se ha estudiado el efecto de los trabajos a turnos, y se ha observado una disminución en el número de transcripciones rítmicas de todo el genoma en células mononucleares de sangre periférica (Kervezee *et al.*, 2018). Además, la exposición a largo plazo al trabajo a turnos nocturno se asocia con niveles más altos de glóbulos blancos totales, neutrófilos, linfocitos y monocitos, lo que indica una desregulación del sistema inmunitario (Wirth *et al.*, 2017). Todo esto puede contribuir al aumento de la incidencia de accidentes cardiovasculares en los trabajadores por turnos.

4.2.2. Ritmos hematológicos y cáncer

La interrupción de los ritmos circadianos ha sido relacionada con el desarrollo de cáncer y la progresión del tumor. Los tejidos normales y malignos a menudo muestran asincronías en la proliferación celular y los ritmos metabólicos. Se han descubierto alteraciones de los genes reloj en líneas celulares de cáncer linfocítico. El gen *BMAL1* es silenciado transcripcionalmente por la hipermetilación de la isla promotora CpG en neoplasias malignas hematológicas, como el linfoma difuso de células B grandes y las leucemias linfocítica y mieloide agudas. De acuerdo con esto, la eliminación de *BMAL1* mediante ARNi mejora el crecimiento tumoral en células no metiladas, mientras que la reintroducción de *BMAL1* provoca la inhibición del crecimiento tumoral en células hipermetiladas de linfoma y leucemia. También se demostró que la inactivación epigenética de *BMAL1* contribuye al desarrollo de neoplasias malignas hematológicas al alterar el reloj circadiano celular (Taniguchi *et al.*, 2009).

La expresión rítmica de los genes reloj está significativamente perturbada en los leucocitos de pacientes con leucemia mieloide (Yang *et al.*, 2011). La alteración de la expresión de los genes reloj también se ha informado en muestras de sangre periférica de pacientes con leucemia linfocítica y en leucocitos de pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, aunque ambos estudios incluyeron solo un punto de tiempo (Hsu *et al.*, 2014; Rana *et al.*, 2014). Por último, las oscilaciones diarias en la actividad de las enzimas antioxidantes están significativamente perturbadas en los eritrocitos de pacientes con cáncer oral (Subramanian *et al.*, 2005) y ratas Wistar con carcinoma mamario (Kolanjiappan y Manoharan, 2005). Por lo tanto, existe abundante evidencia de que las propiedades rítmicas de las células sanguíneas se alteran en los organismos con cáncer. Sin embargo, basándose únicamente en estos resultados,

es imposible determinar si estas anomalías son una causa o una consecuencia del proceso de la enfermedad.

Los ritmos hematológicos también son relevantes para el tratamiento del cáncer, ya que los efectos inmunosupresores de los medicamentos contra el cáncer varían notablemente según el momento de la administración del fármaco (Peleg *et al.*, 1989). El agente quimioterapéutico ciclofosfamida, inhibe la producción de linfocitos y en el momento de transición de oscuridad a luz los ratones tratados fueron más sensibles al fármaco que en el momento de transición de la luz a oscuridad (Gorbacheva *et al.*, 2005). El impacto del tratamiento con interferón- α en el número de leucocitos también depende de cuándo se administre (Shinohara *et al.*, 2008). Aunque se desconoce la base mecánica de estos efectos, tienen claras implicaciones terapéuticas. Mediante la administración de estos compuestos en sus puntos de tiempo menos tóxicos, podrían emplearse con seguridad dosis mayores, mejorando así la eficacia del tratamiento del cáncer (Lévi *et al.*, 2007). Hay que tener en cuenta que estos puntos de tiempo óptimos pueden variar entre individuos, dependiendo de su genotipo de reloj circadiano.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este trabajo han sido:

1. A nivel fisiológico, debido a la existencia de ritmos circadianos en todos los parámetros del sistema hematológico estudiados, para evitar la influencia de diferentes variables en la determinación de los valores normales de la especie, es imprescindible realizar siempre la extracción de muestras a la misma hora y en las mismas condiciones para que todas las sustancias se encuentren siempre en el mismo punto de su ciclo circadiano.
2. A nivel patológico, es imprescindible conocer el ritmo circadiano al que están sometidas diferentes sustancias y células sanguíneas y tenerlo en cuenta para el uso de fármacos, y así administrarlos en su momento de máxima eficacia con el fin de administrar una dosis menor del fármaco y lograr una mayor efectividad del mismo, lo que es la esencia de un tratamiento

6. REFERENCIAS

- Abo, T., Kawate, T., Itoh, K. and Kumagai, K. (1981) "Studies on the bioperiodicity of the immune response. I. Circadian rhythms of human T, B, and K cell traffic in the peripheral blood.", *Journal of immunology*, 126(4), pp. 1360–1363.
- Ando, N., Nakamura, Y., Ishimaru, K., Ogawa, H. *et al.* (2015) "Allergen-specific basophil reactivity exhibits

daily variations in seasonal allergic rhinitis", *Allergy*, 70(3), pp. 319-322.

Aoyagi, M., Watanabe, H., Sekine, K., Nishimuta, T. *et al.* (1999) "Circadian variation in nasal reactivity in children with allergic rhinitis: correlation with the activity of eosinophils and basophilic cells", *International archives of allergy and immunology*, 120, pp. 95-99.

Arendt, J. (2000) "Melatonin, Circadian Rhythms, and Sleep", *New England Journal of Medicine*, 343(15), pp. 1114-1116.

Aroca-Crevillén, A., Adrover, J. M. y Hidalgo, A. (2020) "Circadian Features of Neutrophil Biology", *Frontiers in Immunology*, 11: 576.

Arteaga, A. P., (1993) *Contribución al estudio de la cronofisiología: aspectos experimentales*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Aschoff, J. (1981) *Biological Rhythms: Handbook of behavioral Neurobiology*. New York: Plenum Press.

Baumann, A., Gönnerwein, S., Bischoff, S. C., Sherman, H. *et al.* (2013) "The circadian clock is functional in eosinophils and mast cells", *Immunology*, 140(4), pp. 465-474.

Benstaali, C., Mailloux, A., Bogdan, A., Auzéby, A. *et al.* (2001) "Circadian rhythms of body temperature and motor activity in rodents: Their relationships with the light-dark cycle", *Life Sciences*, 68(24), pp. 2645-2656.

Besedovsky, L., Born, J. y Lange, T. (2014) "Endogenous glucocorticoid receptor signaling drives rhythmic changes in human T-cell subset numbers and the expression of the chemokine receptor CXCR4", *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(1), pp. 67-75.

Boivin, D. B., James, F. O., Wu, A., Cho-Park, P. F., *et al.* (2003) "Circadian clock genes oscillate in human peripheral blood mononuclear cells", *Blood*, 102(12), pp. 4143-4145.

Borjigin, J., Zhang, L. S. y Calinescu, A. A. (2012) "Circadian Regulation of Pineal Gland Rhythmicity", *Molecular and cellular endocrinology*, 349(1), pp. 13-19.

Brainard, G. C., Lewy, A. J., Menaker, M., Fredrickson, R. H., *et al.* (1988) "Dose-response relationship between light irradiance and the suppression of plasma melatonin in human volunteers", *Brain research*, 454(1-2), pp. 212-218.

Brown, H. E. y Dougherty, T. F. (1956) "The diurnal variation of blood leucocytes in normal and adrenalectomized mice", *Endocrinology*, 58(3), pp. 365-375.

Caba, M. y Valdez, P. (2015) *Ritmos circadianos de la célula al ser humano*. México: Universidad Veracruzana.

Carpenter, G. A. y Grossberg, S. (1984) "A neural theory of circadian rhythms: Aschoff's rule in diurnal and nocturnal mammals", pp. R1067-R1082

Carrick, J. B. and Begg, A. P. (2008) "Peripheral Blood Leukocytes", *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 24(2), pp. 239-259.

Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L. A., Nombela-Arrieta, C., *et al.* (2013) "Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance", *Cell*, 153(5), pp. 1025-1035.

Castanon-Cervantes, O., Wu, M., Ehlen, J. C., Paul, K., *et al.* (2010) "Dysregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption", *Journal of immunology*, 185(10), pp. 5796-5805.

Cermakian, N., Stegeman, S. K., Tekade, K. y Labrecque, N. (2022) "Circadian rhythms in adaptive immunity and vaccination", *Seminars in immunopathology*, 44(2), pp. 193-207.

Crnko, S., Du Pré, B. C., Sluijter, J. P. G. y Van Laake, L. W. (2019) "Circadian rhythms and the molecular clock in cardiovascular biology and disease", *Nature Reviews Cardiology*, 16(7), pp. 437-447.

Crowley, S. J. y Eastman, C. I. (2015) "Phase advancing human circadian rhythms with morning bright light, afternoon melatonin, and gradually shifted sleep: can we reduce morning bright light duration?", *Sleep medicine*, 16(2), pp. 288-297.

Damiola, F., Le Minli, N., Preitner, N., Kornmann, B., *et al.* (2000) "Restricted feeding uncouples circadian

- oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus", *Genes & Development*, 14(23), pp. 2950-2961.
- Davis, S. y Mirick, D. K. (2006) "Circadian Disruption, Shift Work and the Risk of Cancer: A Summary of the Evidence and Studies in Seattle", *Cancer Causes & Control*, 17(4), pp. 539–545.
- Dawson, D., Lack, L. y Morris, M. (1993) "Phase resetting of the human circadian pacemaker with use of a single pulse of bright light", *Chronobiology international*, 10(2), pp. 94–102.
- Do, M. T. H. y Yau, K. W. (2010) "Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells", *Physiological reviews*, 90(4), pp. 1547-1581.
- Dubocovich, M. L., Rivera-Bermudez, M. A., Gerdin, M. J. y Masana, M. I. (2003) "Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors", *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 8, pp. 1093-1108.
- Dunlap, J. C. (1999) "Molecular Bases for Circadian Clocks", *Cell*, 96(2), pp. 271–290.
- Egg, M., Paulitsch, M., Ennemoser, Y., Wüstenhagen, A., *et al.* (2014) "Chronodisruption increases cardiovascular risk in zebrafish via reduced clearance of senescent erythrocytes", *Chronobiology international*, 31(5), pp. 680–689.
- Erren, T. C. y Reiter, R. J. (2009) "Defining chronodisruption", *Journal of Pineal Research*, 46(3), pp. 245–247.
- Fortier, E. E., Rooney, J., Dardente, H., Hardy, M.-P., *et al.* (2011) "Circadian variation of the response of T cells to antigen", *Journal of immunology*, 187(12), pp. 6291–6300.
- Friedman, B. S., Steinberg, S. C., Meggs, W. J., Kaliner, M. A., *et al.* (1989) "Analysis of plasma histamine levels in patients with mast cell disorders", *The American journal of medicine*, 87(6), pp. 649–654.
- Fukuya, H., Emoto, N., Nonaka, H., Yagita, K., *et al.* (2007) "Circadian expression of clock genes in human peripheral leukocytes", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(4), pp. 924–928.
- Gallego, M. y Virshup, D. M. (2007) "Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(2), pp. 139–148.
- Gamble, K. L., Berry, R., Frank, S. J. y Young, M. E. (2014) "Circadian Clock Control of Endocrine Factors", *Nature reviews*, 10(8), pp. 466-475.
- Garaulet, M. (2015) "La cronobiología, la alimentación y la salud", *Mediterráneo económico*, 27, pp. 101–122.
- Gorbacheva, V. Y., Kondratov, R. V., Zhang, R., Cherukuri, S., *et al.* (2005) "From the Cover: Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK/BMAL1 transactivation complex", *National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), pp. 3407-3412.
- Hall, A., Karplus, P. A. y Poole, L. B. (2009) "Typical 2-Cys Peroxiredoxins: Structures, mechanisms and functions", *The FEBS journal*, 276(9), pp. 2469-2477.
- Haus, E., Lakatua, D. J., Swoyer, J. y Sackett-Lundeen, L. (1983) "Chronobiology in hematology and immunology", *The American journal of anatomy*, 168(4), pp. 467–517.
- Haus, E. y Smolensky, M. H. (1999) "Biologic rhythms in the immune system", *Chronobiology international*, 16(5), pp. 581–622.
- Hirota, T. y Fukada, Y. (2004) "Resetting Mechanism of Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals", *Zoological Society of Japan*, 21(4), pp. 359–368.
- Hsu, C. M., Lin, P. M., Lai, C. C., Lin, H. C., *et al.* (2014) "PER1 and CLOCK: potential circulating biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma", *Head & neck*, 36(7), pp. 1018–1026.
- Jafri, S. M., VanRollins, M., Ozawa, T., Mammen, E. F., *et al.* (1992) "Circadian variation in platelet function in healthy volunteers", *The American journal of cardiology*, 69(9), pp. 951–954.
- Kecklund, G. y Axelsson, J. (2016) "Health consequences of shift work and insufficient sleep", *BMJ (Clinical research ed.)*, 355: i5210.

- Keller, M., Mazuch, J., Abraham, U., Eom, G. D., *et al.* (2009) "A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses", *National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), pp. 21407-21412.
- Kervezee, L., Cuesta, M., Cermakian, N. y Boivin, D. B. (2018) "Simulated night shift work induces circadian misalignment of the human peripheral blood mononuclear cell transcriptome", *National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(21), pp. 5540-5545.
- Kirsch, S., Thijssen, S., Alarcon Salvador, S., Heine, G. H., *et al.* (2012) "T-cell numbers and antigen-specific T-cell function follow different circadian rhythms", *Journal of Clinical Immunology*, 32(6), pp. 1381-1389.
- Kolanjiappan, K. y Manoharan, S. (2005) "Diurnal rhythmicity of thiobarbituric acid reactive substances and antioxidants in experimental mammary carcinogenesis.", *Experimental Oncology*, 27(4), pp. 298-302.
- Kuhlman, S. J., Craig, L. M. y Duffy, J. F. (2018) "Introduction to Chronobiology", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(9): a033613.
- Labrecque, N. and Cermakian, N. (2015) "Circadian clocks in the immune system", *Journal of Biological Rhythms*, 30(4), pp. 277-290.
- Lévi, F., Focan, C., Karaboué, A., de la Valette, V., *et al.* (2007) "Implications of circadian clocks for the rhythmic delivery of cancer therapeutics", *Advanced drug delivery reviews*, 59(9-10), pp. 1015-1035.
- Lewy, A. J. y Sack, R. L. (1989) "The dim light melatonin onset as a marker for circadian phase position", *Chronobiology international*, 6(1), pp. 93-102.
- Liu, Z. y Chu, G. (2012) "Chronobiology in mammalian health", *Molecular Biology Reports*, 40(3), pp. 2491-2501.
- Logan, R. W., Zhang, C., Murugan, S., O'Connell, S., *et al.* (2012) "Chronic shift-lag alters the circadian clock of natural killer cells and promotes lung cancer growth in rats", *Journal of Immunology*, 188(6), pp. 2583-2591.
- Madrid, J. (1991) "Cronobiología y Experimentacion Animal", *Research in Surgery*, 9, pp. 10-24.
- de Mairan, J.-J. (1729) "«Observation botanique»", *Historire de L'Academie Royale des Sciences*, pp. 35-36.
- van der Meijden, P. E. J. y Heemskerk, J. W. M. (2018) "Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives", *Nature Reviews Cardiology*, 16(3), pp. 166-179.
- Meijer, J. H. (2001) "Photic Entrainment in Mammals", en Takahasi, J. S., Turek, F. W. y Moore, R. Y. (eds.), *Circadian Clocks (Handbook of Behavioral Neurobiology)*. Nueva York: Springer, pp. 183-222.
- Meyer-Bernstein, E. L., Jetton, A. E., Matsumoto, S. I., Markuns, J. F., *et al.* (1999) "Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters", *Endocrinology*, 140(1), pp. 207-218.
- Moore, R. (1991) "The suprachiasmatic nucleus and the circadian system", en Klein, D., Moore, R., and Reppert, S. (eds.) *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. New York: Oxford University Press, pp. 13-15.
- Münch, M. y Bromundt, V. (2012) "Light and chronobiology: implications for health and disease", *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 14(4), pp. 448-453.
- O'Neill, J. S. y Reddy, A. B. (2011) "Circadian clocks in human red blood cells", *Nature*, 469(7331), pp. 498-504.
- Ohkura, N., Oishi, K., Sudo, T., Hayashi, H., *et al.* (2009) "CLOCK regulates circadian platelet activity", *Thrombosis research*, 123(3), pp. 523-527.
- Oishi, K., Ohkura, N., Kadota, K., Kasamatsu, M., Shibusawa, K., Matsuda, J., Machida, K., Horie, S. and Ishida, N. (2006) "Clock mutation affects circadian regulation of circulating blood cells", *Journal of Circadian Rhythms*, 4 : 13.
- Orozco-Solis, R. y Sassone-Corsi, P. (2014) "Epigenetic control and the circadian clock: Linking metabolism to neuronal responses", *Neuroscience*. Pergamon, 264, pp. 76-87.
- Panzer, S. E., Dodge, A. M., Kelly, E. A. B. and Jarjour, N. N. (2003) "Circadian variation of sputum inflammatory cells in mild asthma", *The Journal of allergy and clinical immunology*, 111(2), pp. 308-312.

- Peleg, L., Ashkenazi, I. E., Carlebach, R. y Chaitchik, S. (1989) "Time-dependent toxicity of drugs used in cancer chemotherapy: separate and combined administration", *International journal of cancer*, 44(2), pp. 273–275.
- Pittendrigh, C. S. (1960) "Circadian rhythms and the circadian organization of living systems.", *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 25, pp. 159–184.
- Prendergast, B. J., Cable, E. J., Patel, P. N., Pyter, L. M., *et al.* (2013) "Impaired Leukocyte Trafficking and Skin Inflammatory Responses in Hamsters Lacking a Functional Circadian System", *Brain, behavior, and immunity*, 32, pp. 94–104.
- Rana, S., Munawar, M., Shahid, A., Malik, M., *et al.* (2014) "Deregulated expression of circadian clock and clock-controlled cell cycle genes in chronic lymphocytic leukemia", *Molecular biology reports*, 41(1), pp. 95–103.
- Reppert, S. M. y Weaver, D. R. (2002) "Coordination of circadian timing in mammals", *Nature*, 418(6901), pp. 935–941.
- Revell, V. L. y Eastman, C. I. (2005) "How to Trick Mother Nature into Letting You Fly Around or Stay Up All Night", *Journal of biological rhythms*, 20(4), pp. 353–365.
- Rhee, S. G., Jeong, W., Chang, T. S. y Woo, H. A. (2007) "Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: Its discovery, mechanism of action, and biological significance", *Kidney International*, 72(106), pp. S3–S8.
- Riede, S. J., Van Der Vinne, V. y Hut, R. A. (2017) "The flexible clock: predictive and reactive homeostasis, energy balance and the circadian regulation of sleep-wake timing", *The Journal of experimental biology*, 220(Pt 5), pp. 738–749.
- Rubio-Sastre, P., Gómez-Abellán, P., Martínez-Nicolas, A., Ordovás, J. M., *et al.* (2014) "Evening physical activity alters wrist temperature circadian rhythmicity", *Chronobiology international*, 31(2), pp. 276–282.
- Sack, R. L., Lewy, A. J. y Hughes, R. J. (2009) "Use of melatonin for sleep and circadian rhythm disorders" *Annals of medicine*, 30(1), pp. 115–121.
- Sánchez Barceló, E. J. (2021) *Ocho hitos en la historia de la cronobiología*. España: Editorial de la Universidad de Cantabria.
- Scheer, F. A. J. L., Michelson, A. D., Frelinger, A. L., Evoniuk, H., *et al.* (2011) "The Human Endogenous Circadian System Causes Greatest Platelet Activation during the Biological Morning Independent of Behaviors", *PLoS ONE*, 6(9): e24549.
- Shinohara, A., Koyanagi, S., Hamdan, A. M., Matsunaga, N., *et al.* (2008) "Dosing schedule-dependent change in the disruptive effects of interferon-alpha on the circadian clock function", *Life sciences*, 83(15–16), pp. 574–580.
- Slominski, R. M., Reiter, R. J., Schlabritz-Loutsevitch, N., Ostrom, R. S. *et al.* (2012) "Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions", *Molecular and Cellular Endocrinology*, 351(2), pp. 152–166.
- Smolensky, M. H., Lemmer, B. y Reinberg, A. E. (2007) "Chronobiology and chronotherapy of allergic rhinitis and bronchial asthma", *Advanced Drug Delivery Review*, 59(9–10), pp. 852–882.
- Smolensky, M. H. y Peppas, N. A. (2007) "Chronobiology, drug delivery, and chronotherapeutics", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(9–10), pp. 828–851.
- Stone, K. D., Prussin, C. y Metcalfe, D. D. (2010) "IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils", *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), pp. S73–80.
- Storm Van's Gravesande, K., Mattes, J., Grüntjens, T., Kopp, M., *et al.* (1999) "Circadian variation of urinary eosinophil protein X in asthmatic and healthy children", *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 29(11), pp. 1497–1501.
- Subramanian, P., Manoharan, S., Baskar, A. A. y Manivasagam, T. (2005) "Circadian rhythmicity of plasma lipid peroxidation and antioxidants in oral squamous cell carcinoma", *Singapore medical journal*, 46(4), pp. 184–188.

- Tahara, Y. y Shibata, S. (2013) "Chronobiology and nutrition", *Neuroscience*, 253, pp. 78–88.
- Takahashi, J. S., Hong, H. K., Ko, C. H. y McDearmon, E. L. (2008) "The Genetics of Mammalian Circadian Order and Disorder: Implications for Physiology and Disease", *Nature reviews. Genetics*, 9(10), pp. 764-775.
- Taniguchi, H., Fernández, A. F., Setién, F., Ropero, S., *et al.* (2009) "Epigenetic inactivation of the circadian clock gene BMAL1 in hematologic malignancies", *Cancer Research*, 69(21), pp. 8447–8454.
- Thomas, J. M., Kern, P. A., Bush, H. M., McQuerry, K. J., *et al.* (2020) "Circadian rhythm phase shifts caused by timed exercise vary with chronotype", *JCI Insight*. 5(3):e134270.
- Tofler, G. H., Brezinski, D., Schafer, A. I., Czeisler, C. A., *et al.* (1987) "Concurrent morning increase in platelet aggregability and the risk of myocardial infarction and sudden cardiac death", *The New England journal of medicine*, 316(24), pp. 1514–1518.
- Tracey, C. J., Pan, X., Catterson, J. H., Harmar, A. J., *et al.* (2012) "Diurnal expression of the thrombopoietin gene is regulated by CLOCK", *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10(4), pp. 662–669.
- Waugh, A. y Grant, A. (2010) "The blood", en Waugh, A. y Grant, A. (eds.), *Anatomy and Physiology in Health and Illness*. 12ª ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp. 61–80.
- Wirth, M. D., Andrew, M. E., Burchfiel, C. M., Burch, J. B., *et al.* (2017) "Association of shiftwork and immune cells among police officers from the Buffalo Cardio-Metabolic Occupational Police Stress study", *Chronobiology international*, 34(6), pp. 721-731.
- Wolthers, O. D. y Heuck, C. (2003) "Circadian variations in serum eosinophil cationic protein, and serum and urine eosinophil protein X", *Pediatric Allergy and Immunology*, 14(2), pp. 130–133.
- Yang, M. Y., Yang, W. C., Lin, P. M., Hsu, J. F., *et al.* (2011) "Altered expression of circadian clock genes in human chronic myeloid leukemia", *Journal of Biological Rhythms*, 26(2), pp. 136–148.