

El reloj biológico, marcapasos de la vida. Cronobiología y envejecimiento

Alejandro Lucas-Sánchez¹, Pilar Mendiola², Jorge de Costa³

Departamento de Fisiología. Universidad de Murcia.

alucas@um.es¹, pimelo@um.es², jcoru@um.es³

INTRODUCCIÓN

El paso del tiempo afecta a todos los organismos provocando una serie de cambios que tienen como consecuencia una limitación de la capacidad de responder a las variaciones que se producen en el medio ambiente, disminuyendo, por tanto, la capacidad de adaptarse a ellos. Esta incapacidad de respuesta orgánica aumenta la fragilidad del organismo y conduce finalmente a la muerte del individuo. El envejecimiento es este proceso de deterioro, progresivo e irreversible, que impide a los organismos desenvolverse en su entorno.

En el caso del ser humano, el paso del tiempo produce en personas de avanzada edad fragilidad ósea, pérdida de masa muscular, problemas cardiovasculares, reducción de la capacidad pulmonar, o el desarrollo de diabetes reflejando la pérdida del mantenimiento de la homeostasis. Las personas mayores son más susceptibles de padecer enfermedades infecciosas, autoinmunes o cáncer, manifestando el deterioro del sistema inmunitario y de la capacidad de eliminar productos dañinos. Algunos problemas neurológicos, que comprometen las funciones de percepción sensorial como la visión y la audición, o la pérdida de memoria, completan un cuadro que refleja la incapacidad de mantener el normal funcionamiento del organismo, comprometiéndolo su integridad fisiológica.

El envejecimiento es un proceso complejo, en el que intervienen numerosos factores y afecta a todas las estructuras del organismo a distintos niveles y no siempre al mismo tiempo. Es, por tanto, un proceso que hay que abordar desde un punto de vista amplio, debido a su pluralidad.

EL SISTEMA CIRCADIANO A LO LARGO DE LA VIDA

Al igual que el resto de estructuras y órganos de un organismo sufren una maduración desde su nacimiento para mostrar su total funcionalidad en la etapa adulta, el sistema circadiano muestra cambios con el desarrollo.

El feto, desde su formación, debido a la fuerte conexión entre la madre y éste, recibe señales cíclicas producidas por aquella, sabiendo en qué momento es de día o de noche mediante los cambios en la concentración circulante de melatonina, o los horarios de alimentación según la cantidad de nutrientes que le llegan. Antes del nacimiento, aunque algunas estructuras como los núcleos supraquiasmáticos o el tracto retinohipotalámico son funcionales, el número de neuronas que expresan los neurotransmisores vasopresina (AVP) y péptido intestinal vasoactivo (VIP) no llegan a los niveles del adulto, estando los ritmos circadianos del feto, como el de melatonina o cortisol, regulados en su mayor parte por la madre.

El nacimiento marca un punto crítico, ya que el individuo pasa de estar en un ambiente controlado por la madre a ser independiente, enfrentándose a un ambiente cambiante al que debe adaptarse. El sistema circadiano irá madurando, estableciendo nuevas conexiones nerviosas dentro de los núcleos supraquiasmáticos y hacia otras regiones del cerebro, y acomodándose a las nuevas señales ambientales a las que está expuesto. Alrededor de los tres meses de vida, el ritmo de sueño-vigilia comienza a consolidarse, desplazándose los periodos de sueño a la noche (figura 1A). El máximo de conexiones neuronales en el reloj central se alcanza alrededor de los dos años de vida, y durante los primeros años de ésta, los ritmos circadianos irán alcanzando la periodicidad diaria que los caracteriza en la etapa adulta.

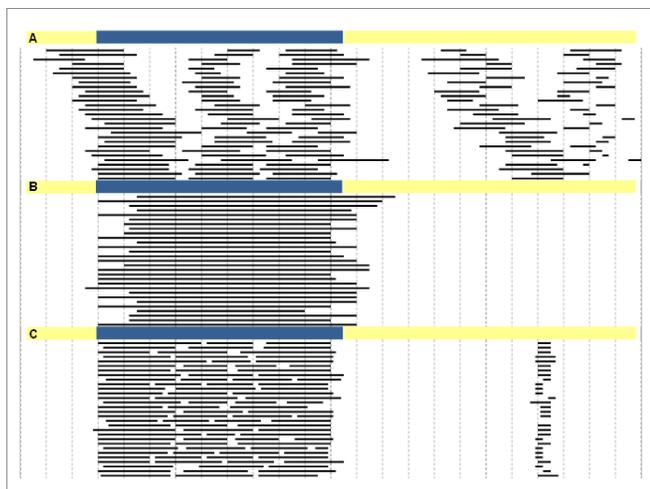


Figura 1. Maduración del ritmo de sueño-vigilia en el ser humano. Las barras azules y amarillas indican el fotoperiodo (oscuridad y luz, respectivamente) y cada día se representa de forma horizontal. La presencia de líneas indica un periodo de sueño. A: ritmo de sueño-vigilia en un recién nacido. B: ritmo de sueño-vigilia en un individuo adulto sano. C: ritmo de sueño-vigilia en un anciano.

Sin lugar a dudas, la adolescencia supone un punto de inflexión para el individuo, ya que, en un corto periodo de tiempo, se convertirá en adulto y la aparición de los diferentes ritmos de hormonas sexuales altera el funcionamiento del sistema circadiano. Los cambios más patentes se encuentran en el ciclo de sueño-vigilia, y se tiende a retrasar el inicio del periodo de sueño, a pesar de que el momento de despertar se mantiene invariable a casa de las obligaciones académicas o laborales. Debido a que en la adolescencia los requerimientos de sueño son mayores, se ve incrementada la somnolencia diurna y aparece el periodo de siesta postprandial. Estos cambios en el ciclo sueño-vigilia provocan un déficit de sueño que puede verse acompañado de cambios en el estado anímico y déficit de rendimiento. Una vez superada esta fase, nos encontramos con un individuo adulto, que representará la etapa más larga de estabilidad en su vida, en el que el sistema circadiano se encuentra totalmente acoplado al funcionamiento del organismo, guardándose una relación de fase estable entre las distintas salidas del reloj, de manera que cada proceso orgánico sucede en su justo momento, o dicho de otro modo, se mantiene el orden temporal interno del individuo. En individuos adultos, los ritmos circadianos se muestran completamente estables, regulares y con una gran amplitud (figura 1B).

EL ENVEJECIMIENTO DEL SISTEMA CIRCADIANO

Como hemos visto, el sistema circadiano sufre numerosos cambios desde el nacimiento del individuo hasta alcanzar una etapa estable en la edad adulta que se mantendrá hasta que, de forma inevitable, el paso del tiempo comience a alterar el correcto funcionamiento del reloj biológico, al igual que al resto de estructuras del organismo. Así mismo, se sabe que la alteración de sistema circadiano puede contribuir a acelerar la aparición de síntomas de envejecimiento en el organismo.

Las principales manifestaciones indicativas del envejecimiento del sistema circadiano son una reducción de la amplitud de los ritmos circadianos, disminuyendo el contraste entre su expresión máxima y mínima, un incremento en la fragmentación y cambios de fase (figura 1C). La causa de estos cambios puede estar en alteraciones a cualquier nivel estructural del sistema circadiano, ya sea a en las entradas al reloj central, en el propio reloj central o en las vías de salida.

La principal vía de entrada de información al reloj central, la luminosa, se ve afectada durante el envejecimiento produciéndose una pérdida de agudeza visual y la reducción del área pupilar, acompañado de una pérdida en la capacidad de transmitir luz azulada (menor de 500nm, la más activa para el sistema circadiano) a través del cristalino. Además, comienzan a deteriorarse las diferentes conexiones aferentes que van a los núcleos supraquiasmáticos. Se estima que los individuos de 55 años reciben menos de la mitad de la información lumínica que la que reciben los individuos de 25 años. Esta reducción en la captación lumínica también se relaciona con el bienestar del individuo y, por ello, las personas con escasa exposición a la luz presentan problemas de sueño y depresión. La concentración sanguínea de melatonina nocturna se reduce produciendo una alteración general del resto de ritmos circadianos, que puede restablecerse, en parte, con la exposición a una iluminación adecuada.

Aunque se piensa que el deterioro del reloj central, se debe a la disminución del número de neuronas, recientes trabajos sugieren la hipótesis de una pérdida de la funcionalidad de las mismas, reduciéndose el número y funcionalidad de las sinapsis. Así, se han descrito alteraciones en la producción de diferentes péptidos como el AVP y VIP, y la pérdida de su expresión circadiana a partir de los 50 años.

Al mismo tiempo, las vías eferentes de los núcleos supraquiasmáticos sufren un deterioro, y la secreción de melatonina, la principal señal de salida que sincronizará al resto del organismo, se ve reducida por cambios que se producen en los receptores de los pinealocitos y por la calcificación, asociada al envejecimiento, de la glándula pineal.

Como se ha mostrado en otros capítulos, el estudio de los ritmos manifiestos, u observables externamente, es la forma más sencilla de determinar la salud del sistema circadiano. De todos los ritmos circadianos, el ritmo de sueño-vigilia es uno de los que mejor refleja el estado del reloj biológico. Es muy común encontrar a las personas mayores durmiendo durante el día: el sueño está fragmentado y el estado de alerta durante el día se ve reducido, atenuándose las diferencias entre el día y la noche, y por tanto reduciéndose la amplitud del ritmo. Además, tienden a adelantar los periodos de sueño y a levantarse antes de lo normal, reflejo del adelanto de fase de su reloj biológico. Otros ritmos, como el de la temperatura corporal central, también se adelantan y reducen su amplitud. La presión arterial pasa a mostrar un ritmo ultradiano de 12 horas de duración. Los ritmos hormonales también se ven afectados, reduciéndose la amplitud del ritmo de secreción de la hormona del crecimiento y en ocasiones de la prolactina. El ritmo circadiano de testosterona se ve reducido hasta desaparecer, y en la mujer, se atenúan las concentraciones circulantes de estradiol y progesterona, mientras que las de las hormonas luteinizante y folículo estimulante se elevan después de la menopausia. En general, se observa cómo los ritmos circadianos se ven alterados con el envejecimiento, pero hay que tener en cuenta que el ritmo manifiesto, el que observamos, es el último eslabón de una cadena que comienza con la captura de información medioambiental y, aunque veamos que el ritmo circadiano está alterado, esta alteración puede proceder de cualquier punto de esa cadena (vías de entrada, reloj central o vías de salida).

Respecto al funcionamiento general del organismo, hay que comprender que el reloj biológico se encarga de que cada proceso fisiológico ocurra en un momento determinado, y todos los procesos guardan una relación de fase unos con otros, existiendo un funcionamiento orgánico armónico. En definitiva, es necesario un orden temporal interno para el correcto funcionamiento del organismo. Podemos compararlo con el funcionamiento de una orquesta, donde el director sería nuestro reloj central, y los distintos instrumentos los diferentes procesos que suceden en nuestro

cuerpo. Cuando el director no indica bien la entrada de cada instrumento, el sonido armónico pasará a ser ruido, y en nuestro organismo se producirá un desorden temporal interno, conocido como cronodisrupción. La cronodisrupción produce cambios perjudiciales para el individuo, como problemas hormonales, deterioro cognitivo, trastornos depresivos, envejecimiento acelerado, baja fecundidad, inmunodepresión, desórdenes de sueño y cáncer. Como se ha mencionado anteriormente, este desajuste temporal puede ser debido al efecto del envejecimiento sobre el sistema circadiano. Sin embargo, diversas situaciones como el estrés, el *jet-lag*, los trabajos a turnos o la exposición a la luz durante la noche también han sido descritas como causantes de cronodisrupción en el organismo y aceleradores del proceso de envejecimiento.

EL ESTUDIO DEL ENVEJECIMIENTO EN EL SISTEMA CIRCADIANO. MODELOS ANIMALES

Queda claro que el envejecimiento es un proceso complejo, en el que se producen numerosos cambios en el organismo. A pesar de que el envejecimiento ha sido, y es, un tema de actualidad y ampliamente abordado, estamos lejos de ser capaces de establecer una teoría que agrupe en conjunto todas las relaciones causa-efecto que se han descrito en numerosos estudios. Muchos de estos estudios han sido llevados a cabo en seres humanos, como hemos visto en este monográfico. Sin embargo, este tipo de estudios son limitados, debido a las restricciones técnicas que puede presentar, como la imposibilidad de diseñar estudios longitudinales, sin mencionar las objeciones éticas que presenta. Es por ello, al igual que en otros campos de la ciencia, que se necesiten modelos experimentales en los que poder desarrollar protocolos de experimentación imposibles de realizar en humanos, y así contribuir a nuestro conocimiento sobre los mecanismos implicados en el envejecimiento.

No todos los animales pueden ser modelos de envejecimiento, ya que deben de cumplir una serie de características. Lógicamente, deben manifestar signos de deterioro relacionados con la edad en el proceso que queramos estudiar. Además, deben de ser próximos filogenéticamente a la especie humana, para facilitar la interpretación y extrapolación de los datos obtenidos. Por último, deben ser especies que tengan un ciclo vital de duración reducida, minimizando el tiempo necesario para diseñar experimentos adecuados. Históricamente, el modelo por excelencia, y no solo en el campo del envejecimiento, ha sido el ratón, ya que se conoce muy bien su biología y es filogenéticamente próximo al hombre. Sin embargo, la

esperanza de vida que presenta es como mínimo de 24 meses, tiempo relativamente elevado. Además, el ratón muestra un comportamiento típico nocturno, al contrario que los humanos, lo que dificulta su utilización en el laboratorio y la extrapolación de los resultados cronobiológicos

Los mamíferos en general presentan partos con un reducido número de crías, lo que incrementa la variabilidad genética de los sujetos para los estudios. Sin embargo, a pesar de las desventajas citadas, los roedores han contribuido enormemente al conocimiento del sistema circadiano y su deterioro con el envejecimiento. En todos los estudios realizados, han mostrado los mismos síntomas observados en los seres humanos, reducción de la amplitud de los ritmos y fragmentación de los mismos, por lo tanto, estos síntomas pueden considerarse como marcadores universales del envejecimiento. La actividad de los núcleos supraquiasmáticos también se ve reducida, y la glándula pineal pierde funcionalidad. Del mismo modo, la actividad de los genes reloj y de las proteínas que codifican se ve alterada con el envejecimiento. Otros estudios relacionan la capacidad de aprendizaje con el estado de salud del sistema circadiano, y no con el envejecimiento en sí. Un hecho interesante es que además de los cambios que se producen en el sistema circadiano con el envejecimiento, las alteraciones en el sistema circadiano aceleran el envejecimiento. Así, distintas especies muestran expectativas de vida menores cuando son sometidas a regímenes de luz-oscuridad menores de 24 horas.

Entre las diferentes especies utilizadas como modelo de envejecimiento está *Caenorhabditis elegans*, un gusano nemátodo de 1 mm de longitud con una esperanza de vida máxima de 2 a 3 semanas, lo que facilita el desarrollo de experimentos que abarquen todo el ciclo vital. El principal problema que presenta este pequeño nemátodo es que está muy alejado filogenéticamente de los vertebrados, dificultando la extrapolación y comparación de los datos obtenidos.

En una situación intermedia entre el ratón y *C. elegans*, en lo que a distancia evolutiva se refiere, nos encontramos a los peces, el grupo de vertebrados más extenso del reino animal. Dentro de este grupo existen especies que muestran características interesantes en cuanto a longevidad y versatilidad para ser modelos de envejecimiento, además de ser animales vertebrados, lo que reduce significativamente la distancia filogenética con los seres humanos. La principal ventaja de los peces es su gran capacidad de aclimatación a un amplio rango de condiciones ambientales. Los peces son particularmente sensibles a variaciones en la temperatura ambiental, lo que facilita la manipulación de la tasa de

envejecimiento, siendo más rápida según incrementamos la temperatura. Otros factores, como la dieta, el espacio disponible en el ambiente y el éxito reproductivo también son factores determinantes. Otra característica interesante es el gran número de huevos que producen por puesta. En la mayoría de los casos, un experimento puede ser llevado con los individuos nacidos de una sola puesta, lo que nos facilita el conocimiento del origen de esos animales, todos ellos con una dotación genética idéntica o muy similar, reduciendo la variabilidad intraespecífica. Finalmente, el coste del mantenimiento de gran número de peces en el laboratorio es menor que el de mamíferos (figura 2).

Invertebrados	Peces	Mamíferos
		
✓ Esperanza de vida reducida	✓ Esperanza de vida reducida o intermedia	✗ Esperanza de vida elevada
✗ Distancia filogenética elevada	✓ Distancia filogenética intermedia	✓ Distancia filogenética reducida
✓ Capacidad proliífica elevada	✓ Capacidad proliífica elevada	✗ Capacidad proliífica reducida
✓ Costes experimentales reducidos	✓ Costes experimentales Reducidos	✗ Costes experimentales elevados
Tamaño reducido	Tamaño reducido	Tamaño intermedio o grande

Figura 2. Ventajas y desventajas de los diferentes grupos de modelos animales para el estudio del envejecimiento. El tamaño puede ser o no una ventaja según el tipo de estudio a realizar.

LOS PECES COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL ENVEJECIMIENTO

Ya desde los años 60 se comenzó a tener en cuenta a los peces como potenciales modelos para el estudio del envejecimiento. Los primeros estudios se realizaron en una especie de guppy (*Lebistes reticularis*), en la que se constató que se podía modular el envejecimiento mediante restricción calórica y manipulación de la temperatura. Del mismo modo, se observó que la capacidad reproductiva se veía afectada con el paso del tiempo. Actualmente, una especie de pez se ha convertido en el nuevo “ratón de laboratorio”: el pez cebra, *Danio rerio*. Este pequeño pez tropical de agua dulce ha sido utilizado principalmente en estudios de biología del desarrollo debido a que sus embriones son transparentes, muestra un rápido desarrollo y una elevada capacidad proliífica (más de 200 huevos por puesta). Estas interesantes características lo han llevado a convertirse en un modelo muy utilizado para diversas disciplinas, llegando a ser uno de los animales más estudiados a nivel genético. El principal problema que plantea el pez cebra para ser un buen modelo de envejecimiento es su esperanza de vida, de como mínimo

2 años; y, aunque mediante manipulación genética puede verse reducida, los datos obtenidos de animales manipulados genéticamente deben de ser interpretados con precaución.

Otro grupo de especies de peces que recientemente están ganando en popularidad en el campo del envejecimiento son los llamados killis. En los años 60 se comenzó a trabajar con estos peces, y se determinó la capacidad de modular el envejecimiento con la temperatura ambiental, a la vez que se determinaron cambios en el hígado y riñón con la edad. Sin embargo, no fue hasta 2004 cuando se comenzó a tener en cuenta a un género en especial, *Nothobranchius*, como potencial modelo de envejecimiento. El género *Nothobranchius* está formado por especies de peces de origen africano que habitan pequeñas charcas de agua generadas por las lluvias estacionales. La principal característica de este género es su reducida expectativa de vida, de 3 a 18 meses según la especie, influenciada por la duración de la estación lluviosa de su hábitat, lo que los hace muy atractivos para desarrollar protocolos experimentales en cortos periodos de tiempo. Además, son animales vertebrados, y no es necesaria una elevada dotación en el laboratorio para su mantenimiento. Toleran un amplio rango de parámetros en el agua y resulta sencillo establecer una colonia.

Desde el 2004, la información disponible en diversos aspectos de la biología del envejecimiento de *Nothobranchius* se ha visto significativamente incrementada, existiendo estudios referentes al crecimiento y supervivencia del género, cambios morfológicos e histológicos que se producen con el paso del tiempo, deterioro de la consolidación de la memoria y cambios comportamentales y deterioro de las funciones bioquímicas, como las actividades de ciertas enzimas o en la composición de las membranas lipídicas. También se han dedicado esfuerzos en la caracterización genética de *Nothobranchius*, identificándose los genes que determinan la longevidad entre las distintas especies de este género y, además de conocerse prácticamente todo su código genético, se ha intentado la generación de individuos transgénicos para incrementar el conocimiento que tenemos del proceso de envejecimiento.

PECES, ENVEJECIMIENTO Y CRONOBIOLOGÍA

El número de trabajos realizados en peces y cronobiología del envejecimiento no es elevado (tampoco lo es incluyendo trabajos en otros animales), por lo que no tenemos una visión completa del proceso. Los trabajos realizados caracterizan los cambios en el sistema circadiano con el envejecimiento utilizando un ritmo manifiesto como marcador: el ritmo de actividad-reposo. Los trabajos

desarrollados en *Nothobranchius* muestran que es una especie diurna, con un ritmo de actividad-reposo estable y regular, que sufre un importante deterioro con el paso del tiempo, perdiendo gran parte de la regularidad y estabilidad, volviéndose más fragmentado y perdiéndose las diferencias entre el día y la noche (la amplitud se ve reducida). En *Nothobranchius* jóvenes, los máximos de actividad motora se localizan alrededor de la hora de alimentación, incrementándose la actividad en los momentos previos a la alimentación, con lo que muestran su capacidad de anticiparse a este evento, hecho característico de un reloj biológico saludable. Con el envejecimiento, esa capacidad de anticipar eventos como la alimentación, se ve reducida (figura 3).

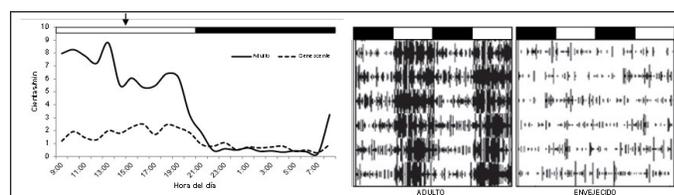


Figura 3. Izquierda: cambios en la onda media de la actividad motora de individuos de *Nothobranchius korthausae* adultos (línea continua) y envejecidos (línea discontinua). La flecha en la parte superior indica el momento de alimentación diaria. Derecha: actogramas dobles con individuos representativos adultos y envejecidos del grupo de los que se han obtenido las ondas medias. En conjunto, se observa una disminución de la amplitud del ritmo de actividad motora y un incremento en la fragmentación en individuos envejecidos, ambos indicadores de un sistema circadiano envejecido. Además, se observan actividades elevadas de individuos adultos previas a la hora de alimentación, indicando que el animal busca de forma activa el alimento. En animales envejecidos, esa capacidad de anticipación se ve reducida. Datos de A. Lucas, Laboratorio de Cronobiología de la Universidad de Murcia.

Otro aspecto interesante es la reducción en la tasa de secreción de melatonina con el envejecimiento. En pez cebra, la amplitud del ritmo de secreción de melatonina se ve reducida hasta 3 veces en peces de 3 años respecto a los de 1 año. El descenso en la secreción de melatonina está asociado con la alteración de algunos procesos rítmicos como el ciclo sueño-vigilia. Esto ha llevado a la utilización de la melatonina como un cronobiótico ya que la administración exógena de melatonina revierte de forma temporal los efectos dañinos del envejecimiento sobre el ritmo de actividad-reposo y el sueño, tanto en pez cebra como en *Nothobranchius*. La expresión de genes reloj también se ve alterada con el envejecimiento, reduciéndose la amplitud del ritmo circadiano de expresión de los genes *zBmal1*, *zPer1* y *zClock1*, al tiempo que en *zBmal1* se produce un retraso en la fase del ritmo.

Anteriormente hemos repasado cómo el sistema

circadiano, en seres humanos, sufre un proceso de maduración hasta llegar a la etapa adulta, y se ha sugerido que, antes de morir, se produce una desorganización previa de los ritmos circadianos que favorece la desorganización del organismo y la muerte del mismo. Con *Nothobranchius* se ha intentado arrojar algo de luz sobre esta hipótesis, mostrando que el ritmo de actividad-reposo sufre un proceso de desorganización secuencial común a todos los individuos estudiados, que llevan a una desorganización completa del orden temporal interno en los días previos a la muerte (figura 4).

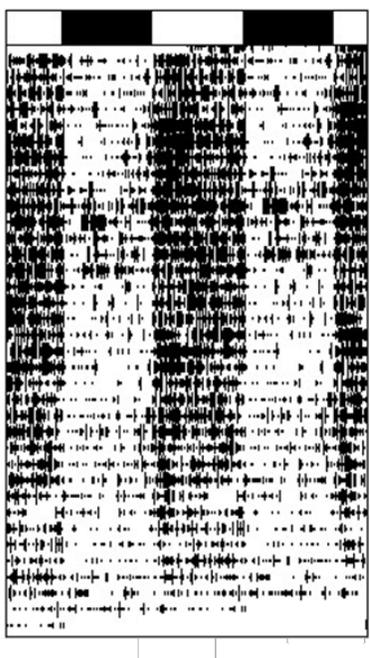


Figura 4. Actograma doble representativo de un individuo de *Nothobranchius rachovii*. En él se presenta el deterioro progresivo del ritmo de actividad motora hasta el momento de su muerte. Datos de A. Lucas, Laboratorio de Cronobiología de la Universidad de Murcia.

En resumen, todos los aspectos descritos en animales, en cuanto a los cambios que se producen en el sistema circadiano con el envejecimiento, se ajustan a lo descrito en seres humanos, por lo que podemos hablar de una universalidad del proceso y que la utilización de modelos puede ayudar en el desarrollo de estrategias para mejorar el bienestar circadiano del organismo. Sin embargo, aún quedan preguntas por responder. Se ha observado que el sistema circadiano sufre cambios con el envejecimiento, pero también que las alteraciones en el mismo pueden provocar una aceleración del envejecimiento. ¿Es entonces el sistema circadiano el marcapasos que determina el proceso de envejecimiento en un organismo? Lo que no cabe lugar a dudas es que la salud circadiana es esencial para la organización temporal de los procesos fisiológicos del

organismo en cualquier etapa de su vida.

REFERENCIAS

- García, J., Rosen, G., Mahowald, M., 2001. Circadian rhythms and circadian rhythms disorders in children and adolescents. *Semin Pediatr Neurol.* 8:229-40.
- Gerhard, G.S., 2007. Small laboratory fish as models for aging research. *Ageing Res. Rev.* 6:64-72.
- Gibson, E.M., Williams, W.P., Kriegsfeld, L.J., 2009. Aging in the circadian system: considerations for health, disease prevention and longevity. *Exp Gerontol.* 44:51-6.
- Hofman, M.A., Swaab, D.F., 2006. Living by the clock: The circadian pacemaker in older people. *Ageing Res Rev.* 5:33-51.
- Lucas-Sánchez, A., Almada-Pagán, P.F., Mendiola, P., de Costa, J., 2014. *Nothobranchius* as a model for aging studies. A review. *Aging Dis.* 5:281-291.
- Myers, B.L., Badia, P., 1995. Changes in circadian rhythms and sleep quality with aging: mechanism and interventions. *Neurosci Biobehav Rev.* 19:553-71.
- Turek, F.W., Penev, P., Zhang, Y., van Reeth, O., Zee, P., 1995. Effects of age on the circadian system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 19:53-58.
- Weinert, D., 2000. Age-dependent changes of the circadian system. *Chronobiol. Int.* 17:261-283.
- Weinert, D., 2005. Ontogenetic development of the mammalian circadian system. *Chronobiol. Int.* 22:179-205.
- Zhdanova, I.V., Reeb, S.G., 2006. Circadian Rhythms in Fish. In: Sloman, K.A., Wilson, R. W., Balshine, S. (Eds.), *Behaviour and physiology of fish*. Elsevier Academic Press, Amsterdam; London, pp. 197-238.