



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

Quien viajando cruzó alguna vez varios husos horarios sabe que tiene, evidentemente, un reloj interno que controla su ritmo de sueño y vigilia. Después de llegar a destino, el viajero se sentirá cansado y abatido durante los primeros días, y le llevará cierto tiempo adaptarse al nuevo ciclo diurno-nocturno. Si la persona no viaja, pero cada fin de semana está despierta hasta altas horas de la madrugada y luego duerme hasta el mediodía, sentirá indefectiblemente el impacto de sus trasnochadas al comenzar la semana. Este efecto es la respuesta de nuestro reloj interno que ya comien-

idea de un "reloj interno". Para probar el postulado del reloj biológico, Jürgen Aschoff, uno de los investigadores del Instituto Max-Planck ordenó construir un búnker en el subsuelo del instituto de la ciudad de Andechs. Corría, entonces, la década de 1960. El búnker albergaba un laboratorio subterráneo, en el cual un grupo de probandos vivió durante varias semanas en aislamiento total del desarrollo natural de un día. No había relojes ni periódicos, ni radios o televisión, menos aún luz diurna. No contaban con datos que les informaran del paso del tiempo, es decir lo que sucedía en el



El reloj de nuestros genes

Cómo los investigadores descifran el mecanismo del reloj de las células

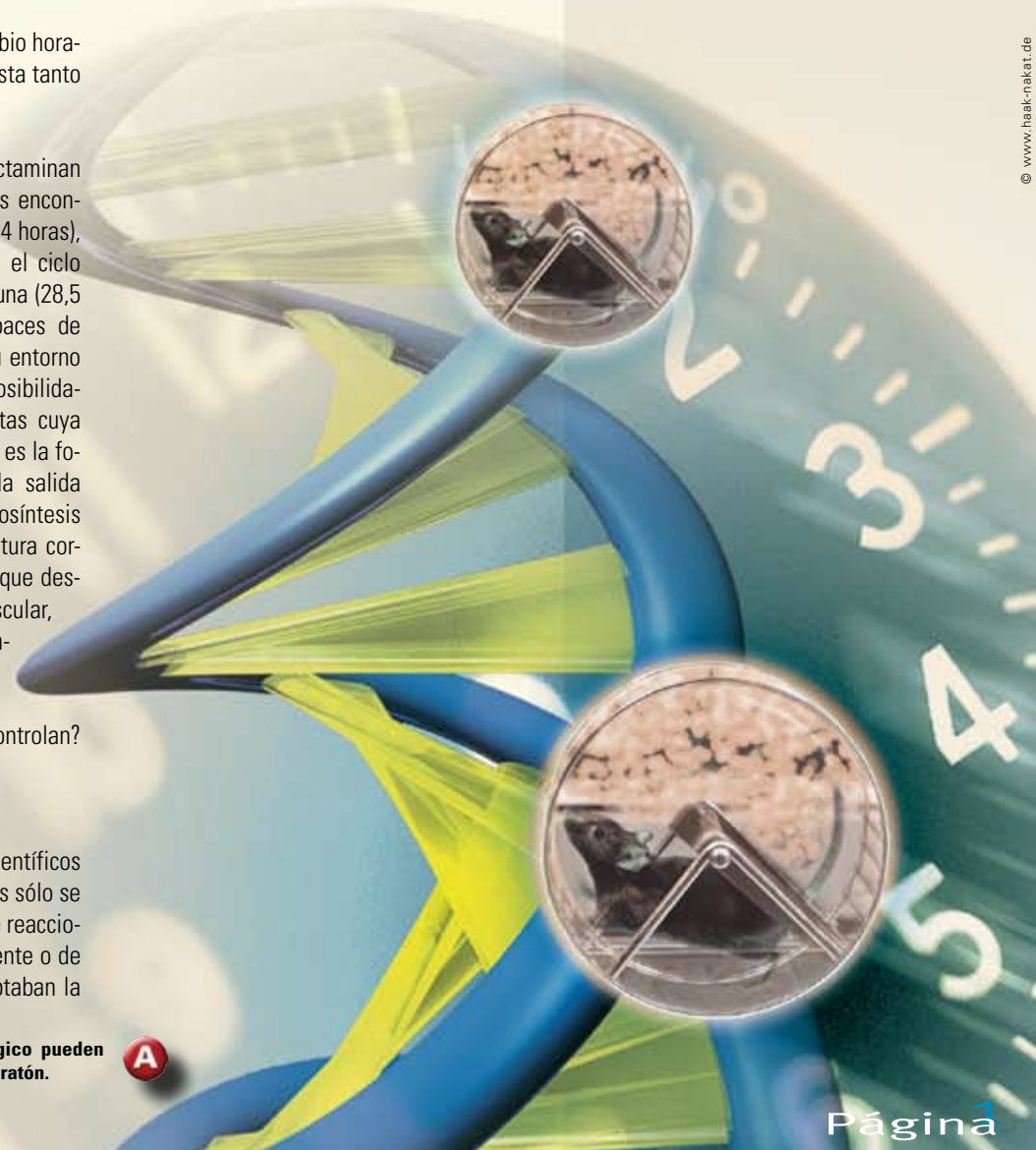
za a atrasar a las 48 horas de un cambio horario y es el motivo por el cual nos cuesta tanto levantarnos el lunes por la mañana.

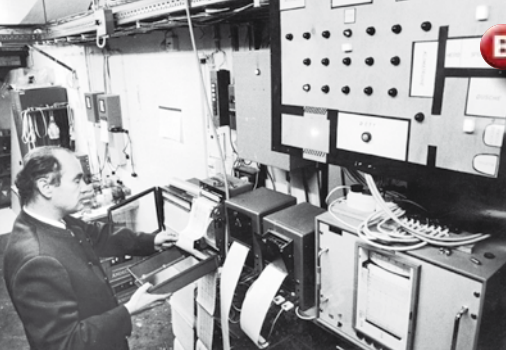
Los ritmos que marca el tiempo dictaminan cómo transcurrirá la vida. Entre ellos encontramos los ciclos diurno y nocturno (24 horas), el ciclo de las mareas (12,5 horas), el ciclo anual (365,25 días), y el ciclo de la luna (28,5 días). Los organismos que son capaces de predecir los cambios regulares de su entorno poseen una ventaja que mejora sus posibilidades de supervivencia. Así, las plantas cuya actividad metabólica más importante es la fotosíntesis, anticipan, por ejemplo, la salida del sol, al activar su aparato de fotosíntesis antes de que amanezca. La temperatura corporal del hombre aumenta antes de que despierte, y el metabolismo, el tono muscular, la función renal y la capacidad de concentración varían a ritmo diario. ¿Cómo se generan estos ritmos? ¿Dónde se encuentran los centros que los controlan? ¿Cómo se los sincroniza?

LA VIDA SIN CRONÓMETRO

Hasta el siglo XX, la mayoría de los científicos naturalistas creían que los seres vivos sólo se comportan de manera rítmica, porque reaccionan a las señales de su medio ambiente o de su entorno. Apenas unos pocos aceptaban la

► Las bases genéticas del reloj biológico pueden investigarse en el sistema modelo de un ratón.





▲ Los voluntarios encerrados vivieron completamente aislados del mundo exterior. A pesar de ello, los científicos podían registrar sus actividades en los "ensayos del búnker" de la ciudad de Andechs, mediante contactos que al ser pisados activaban el encendido de una lamparita en un panel, y con tiras medidoras que indicaban las funciones corporales más importantes de los participantes del ensayo.

→ mundo exterior. Los científicos registraban el comportamiento y determinados parámetros fisiológicos de sus probandos y los sometían regularmente a pruebas de concentración, de estado de ánimo y de desempeño (Fig. B). Como quedó demostrado, los participantes del ensayo siguieron participando de una actividad de ritmo diario a pesar de su aislamiento

to, ya que dormían regularmente entre siete y ocho horas. Su temperatura corporal oscilaba medio grado durante dicho ciclo. También su desempeño cognitivo seguía una periodicidad endógena diaria, es decir generada desde adentro.

Pero los datos metrológicos revelaron algo más: con el transcurrir de los días y semanas, el ritmo diario fue desplazándose. Las oscilaciones periódicas diarias ya no se producían exactamente cada 24 horas sino que eran más lentas. Por ejemplo, en ciertas personas podían desarrollarse cada 24,7 horas. Todos los días, estas personas alojadas en el búnker subterráneo comenzaban su período de sueño 42 minutos más tarde y se despertaban 42 minutos después. Es evidente que nuestro reloj interno se ajusta exactamente a las 24 horas, pero en el aislado mundo subterráneo muestra su verdadera configuración: es un reloj independiente con cuerda para casi 24 horas, pero que no responde exactamente a un día. Por eso lo llamamos **reloj circadiano** (del lat. *circa: cercano, diem: día* = aproximadamente un día).

¿QUIÉN MARCA EL RITMO?

También fue interesante comprobar que la temperatura corporal y el ciclo de sueño-vigilia normalmente se mueven al mismo compás. La temperatura corporal oscila, en un margen de 25 horas, teniendo su punto más bajo durante el sueño y con un pico durante la vigilia. Pero si el ciclo de sueño-vigilia se desplaza debido al aislamiento total, la temperatura corporal no se comporta de la

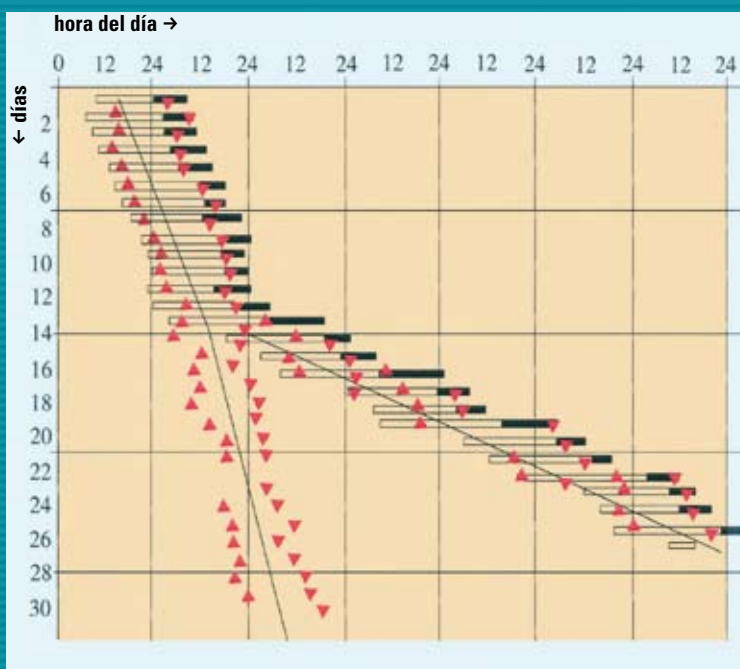
misma manera (véase el recuadro inferior) y seguirá oscilando a un ritmo de 25 horas independientemente de que el ciclo del sueño se acorte, se prolongue o se vuelva irregular. De ello, los científicos concluyeron que debe haber más de un reloj interno.

Los relojes internos controlan todas las funciones vitales importantes y la conducta condicionada por los distintos ciclos diarios. En el caso de las plantas, están distribuidos en todo su sistema. No puede establecerse un centro supraordinado, o reloj maestro. En el reino animal es diferente, ya que los investigadores que en la década de 1970 estudiaban la anatomía del cerebro de ratas descubrieron fibras nerviosas extremadamente delgadas, que desde la retina del ojo no conducían al centro de la visión en el lóbulo occipital, sino que terminaban su recorrido en una pequeña zona del diencefalo ubicada casi encima del *quiasma óptico*, el punto, donde se cruzan los nervios ópticos. Cuando esta zona diminuta cubierta de neuronas, de apenas el tamaño de una cabeza de alfiler es destruida, los animales pierden toda noción del ritmo de lo cotidiano, que comprende desde el ciclo de sueño-vigilia, pasando por variaciones hormonales hasta la periodicidad de la temperatura corporal. El reloj central había sido encontrado.

En virtud de su ubicación sobre el quiasma, la zona fue llamada "núcleo supraquiasmático", o NSQ. En las ratas, los núcleos distribuidos en forma simétrica en ambas mitades del cerebro, miden menos de un milímetro y comprenden alrededor de 16.000 células.

RELOJES FUERA DE HORA

En la situación normal, los relojes del ciclo sueño-vigilia y de la temperatura corporal están acoplados entre sí, por lo cual vibran armónicamente. Sin embargo, debido a las condiciones extraordinarias del aislamiento del hábitat subterráneo, a veces se desacoplan y cada uno sigue su propio ritmo. El gráfico muestra cómo los máximos y mínimos de la temperatura corporal (triángulos rojos) transcurren en forma paralela al ciclo de sueño-vigilia durante los primeros 14 días. La duración de los periodos es de 25,7 horas para ambos ciclos. Después, el ciclo de sueño-vigilia se extiende a 33,4 horas (para que el gráfico pueda visualizarse mejor, no sólo se incorporaron los días sucesivos en forma vertical, sino otros siete días en el eje horizontal). Los científicos hablan de una desincronización interna. Quien haya experimentado alguna vez una "desincronización externa", por ejemplo un *jetlag* o haya tenido que trabajar en turnos nocturnos, sabe el esfuerzo que implica permanecer despierto cuando el desempeño físico llega a su punto más bajo. Ahora ya se sabe que el ritmo de algunas personas también se desincroniza sin necesidad de que estén aisladas o viajen en avión. Debido a ello pueden sufrir depresiones, trastornos del sueño e incluso enfermedades metabólicas serias.

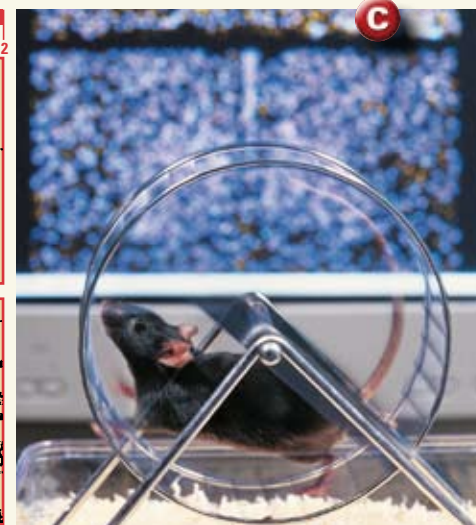
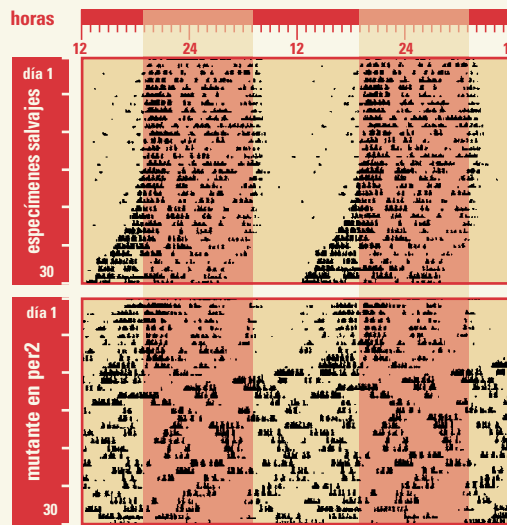


En el hombre son un poco más grandes y albergan aproximadamente 50.000 neuronas. A través de las delgadas fibras nerviosas el NSQ recibe señales de las **células fotosensibles** de los ojos, que no son las células de pequeño tamaño (conos) de la llamada "capa de conos y bastones" en la fovea de la retina. Porque los mutantes de ratón al no poseerlas, también son capaces de adaptarse a los ritmos diarios desplazados artificialmente como siempre lo han hecho. Por eso, los cronobiólogos presumieron que en los ojos de los mamíferos había un sentido más para captar la luz, que brinda información sobre el horario diurno al reloj biológico.

UN NUEVO SENTIDO PARA CAPTAR LA LUZ

En 2002, la revista científica SCIENCE proclamó como "la noticia del año" el descubrimiento de un tipo de células ópticas en la retina de los mamíferos, que hasta la fecha se desconocían. Y justificaba el anuncio, afirmando que: "El descubrimiento de una nueva clase de células fotosensibles que ayuda a dominar los ritmos diarios del cuerpo, podría servir en algún momento para combatir los efectos del jetlag o de la depresión invernal". Se trata de las llamadas **células ganglionares de la retina**. Una pequeña parte de ellas, contiene un pigmento fotosensible que se llama "melanopsina". Cuando estas células registran la luz, modifican su conductibilidad eléctrica. El NSQ recibe estas señales neuronales y las transmite a los relojes internos en todos los órganos y células, que gracias a ello quedan sincronizados entre sí y con el desarrollo del día.

Si realizamos un cultivo de neuronas del NSQ, mostrarán actividad eléctrica rítmica: de día las neuronas están eléctricamente activas, en tanto que de noche no. Evidentemente, cada célula del NSQ es un reloj autónomo (!), que marca que es de día. Si cada célula del NSQ constituye un pequeño reloj autónomo, ¿cómo es que a pesar de esto todos marchan al mismo ritmo? Para estudiar este fenómeno, investigadores japoneses implantaron el gen de la proteína fluorescente verde de una medusa en las células del NSQ de ratones. Sin embargo, la proteína solo era producida cuando las células estaban eléctricamente activas. Los investigadores observaron en varios cientos de células, el momento en que se iluminaban y comprobaron que las células se sincronizaban automáticamente: la señal de una célula impulsaba el reloj interno de la próxima y así sucesivamente. Es decir el NSQ es un generador de ritmo autónomo.



Con el NSQ había sido descubierto el reloj de referencia a través del cual se ajustan de nuevo día a día todos los relojes internos. En esta función, el NSQ representa la contracara biológica del reloj atómico del *Physikalisch-Technische Bundesanstalt* (Instituto Físico-Técnico Federal) de la ciudad de Braunschweig, cuyas señales de radio pautan la hora oficial para toda Alemania. Pero en realidad, se ignoraba cuál era el mecanismo del reloj, es decir el oscilador que marcha basado en un período de 24 horas, y los engranajes moleculares más finos mediante los cuales es posible ajustar el reloj para que adelante o atrase. La clave para profundizar en la comprensión de los relojes biológicos fue suministrada nuevamente por la pequeña mosca de la fruta, la *Drosophila*. Desde 1971 se sabía de una mosca mutante, cuyo ritmo biológico diario estaba trastocado por un defecto genético. Los genetistas demoraron trece años en descubrir la pieza de material genético responsable de esta periodicidad circadiana. De este gen, que fue bautizado *period*, depende, evidentemente, el control de la periodicidad endógena de la *Drosophila*.

El aislamiento del gen *period* de la mosca de la fruta preparó el terreno para la nueva "era molecular" de la cronobiología. Los investigadores descubrieron otros dos genes-reloj: *clock* y *timeless*. Luego, en 1997 rápidamente fueron encontrados tres genes *period*, de los cuales por lo menos el primero (*mouse period 1* o *mper1*) está unívocamente emparentado con el gen de la mosca. Ahora bien, aunque sus piezas esenciales coincidan, los genes o las proteínas producidas según sus pautas, pueden cumplir funciones completamente diferentes en los distintos organismos. Todavía no había pruebas de que los genes similares al *period* del ratón realmente pudieran estar

▲ Si se mantiene a un grupo de ratones en total oscuridad durante 30 días, se desplaza su ritmo de caminatas en la rueda giratoria. Aún así es posible reconocer una clara periodicidad. Es evidente que sus relojes internos atrasan en comparación con la hora del día (gráfico superior). Por el contrario, los animales, cuyo gen-reloj *period2* fue modificado por una mutación, quedan completamente fuera del ritmo: se pierde toda regularidad de sus fases de actividad (gráfico inferior).

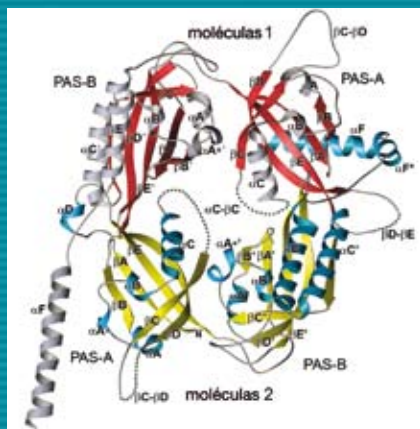
relacionados con el control del ritmo circadiano. Por eso, los científicos del círculo de Gregor Eichele, que en ese momento todavía trabajaba en el *Baylor College of Medicine* de Houston, Texas, EE.UU., analizaron de manera más detallada "la muestra de la expresión" de dichos genes: ¿dónde y cuándo se efectúa la transcripción de los genes *period* del ratón en proteínas?

CÓMO LOGRAR QUE LOS GENES VIBREN

Los estudios confirman la presunción: en el ratón, entre otros, el gen *mper1* está expresado en el NSQ, es decir en el alojamiento del reloj central del sistema circadiano de los animales vertebrados. Su patrón de expresión del tiempo corresponde exactamente a lo que se espera de su gen-reloj. Durante las horas de la mañana, la expresión del gen se incrementa, al mediodía llega a su máximo y comienza a descender hasta llegar otra vez a cero al anochecer. Si realizamos un seguimiento de estas variaciones a lo largo de varios días, comprobaremos que la expresión del gen oscila en periodos de 24 horas. Dicha expresión rítmica-circadiana del gen sigue funcionando aunque los animales de laboratorio sean mantenidos en oscuridad constante.

¿Cómo surge el mencionado patrón rítmico de expresión? El circuito genético del reloj biológico consiste en dos *loops* o circuitos →

TOMA AMPLIADA DE LOS ENGRANAJES DEL RELOJ



Para la generación y el mantenimiento de una periodicidad endógena de 24 horas es decisivo el equilibrio diario entre formación y degradación de las proteínas-reloj centrales. Las diversas proteínas reloj comienzan a interactuar: las proteínas *period* y *timeless* se recombinan en moléculas dobles que inhiben la transcripción de sus genes, y con ello su propia producción. En el Instituto Max-Planck de Fisiología Molecular de Dortmund el interés científico se focaliza especialmente en la estructura molecular de las proteínas-reloj. Los científicos del departamento de Alfred Wittinghofer en el Max-Planck por primera vez hallaron la estructura tridimensional de una parte de la proteína *period* de la mosca *Drosophila* mediante estudios de rayos X del cristal de roca. La estructura *period* también nos permite echar una mirada al mecanismo de una mutación que en la mosca de la fruta desemboca en un ciclo diurno prolongado de 29 horas en lugar de las 24 horas normales. En dichos mutantes, sólo se ha modificado un único resto de aminoácido en la superficie de uno de los dos dominios proteicos (aquí se intercambiaron valin por ácido asparagínico). Los científicos de Dortmund pudieron demostrar que por esta vía, la molécula ya no es capaz de ocupar la estructura espacial que le es propia. Se presume que a través de ello también se influye en la interacción con otras proteínas y que se pierde el *timing* originario.

→ **de retroalimentación** (tanto en la mosca de la fruta como en el ratón o en el hombre), que funcionan como si fueran termostatos y regulan el producto de los genes *period* y *timeless* (en ratón y hombre *period* y *cryptochrom* ½). Si aumenta la concentración de un factor genético (la temperatura) por encima del valor nominal, la producción de la proteína respectiva (la calefacción) se desconecta y se invierte. El retraso temporal entre la actividad de los genes *period* y *timeless* y la producción de las proteínas respectivas genera una oscilación periódica ascendente y descendente. Primero aumenta sostenidamente la concentración de las proteínas reloj en la célula. Pero si supera un máximo, se desconectan los genes. La concentración de las proteínas disminuye hasta que la supresión de los genes-reloj vuelve a quedar sin efecto y el circuito vuelve a comenzar. En el hombre, en realidad, esto sucede transcurridas 25 horas (en la *Drosophila* y el ratón, el período de libre funcionamiento del reloj biológico comprende 23,5 horas). Pero la luz diurna se ocupa de que el sistema de engranajes internos siempre se ajuste un poco y de este modo terminen funcionando en forma sincrónica con el mundo exterior y al ritmo de 24 horas. Gregor Eichele y su personal del Instituto Max-Planck de Endocrinología Experimental de Hannover quieren saber cómo funciona este delicado ajuste entre los genes y el mundo exterior, que se hace todavía más importante cuando los desplazamientos del tiempo son

extremos y el *jetlag* es más serio. ¿Cómo logra el organismo sincronizar su reloj interno con el horario exterior? Para hallar la respuesta, los investigadores trabajan con los llamados **ratones knockout**. Se trata de ratones, en los que ciertos genes se desconectan puntualmente. Un parámetro de medición importante en los estudios es el comportamiento de los ratones en la rueda giratoria: los horarios en los que un ratón de laboratorio siente deseos de subirse a la rueda para descargar energías no se distribuyen arbitrariamente a lo largo del día. Los especímenes normales se atienen a un esquema diario regular: como especie de hábitos nocturnos, el ratón corre casi exclusivamente en la fase de oscuridad.

LOS RATONES EN LA PRUEBA DE LA RUEDA GIRATORIA

Entonces, apenas se apaga la luz del laboratorio, los pequeños roedores comienzan a correr en la rueda. Mediante un interruptor magnético conectado a una computadora se cuentan las revoluciones que su carrera provoca en la rueda (**Fig. C**). Ahora bien, si durante la noche los científicos envían impulsos de luz, los ratones adaptan su ritmo: su reloj interno reacciona a la señal externa. Si el impulso lumínico se da apenas iniciada la noche, los animales piensan que el día es más largo y de acuerdo con ello, comenzarán su actividad más tarde en la noche siguiente; por el contrario, un impulso lumínico cerca

del amanecer adelanta el reloj. En caso de un desplazamiento del tiempo nosotros simplemente podemos adelantar o atrasar las agujas de nuestro reloj pulsera. ¿Pero dónde están los engranajes de ajuste del reloj interno? Los ensayos con ratones *knockout*, a los que se les habían desconectado los genes-reloj *period1* y *period2* o ambos, muestran que *period1* adelanta el reloj interno, mientras que *period2* lo atrasa. Según las mencionadas comprobaciones, dichos genes-reloj juegan un papel decisivo cuando se trata de acostumbrar el organismo a un nuevo ritmo diurno. En este contexto, el *jetlag* después de vuelos intercontinentales sólo es un ejemplo de la importancia de la sincronización entre el horario externo y los relojes internos. Estos hallazgos son importantes también para aplicar a problemas que ocurren en el trabajo de turnos, para la depresión de invierno y en relación con síndromes como el de la fase anticipada (ASPS) o el de la fase retardada de sueño (DSPS). En estos casos, las investigaciones podrían llevarnos a nuevas iniciativas de tratamiento. Existen evidencias de que los resultados son transferibles al hombre: en pacientes que sufren del síndrome de la fase de sueño anticipada (ASPS), es decir los que se despiertan regularmente a las cuatro de la madrugada, en 2001 fue encontrado un gen *period2* defectuoso.

En el ínterin, los investigadores descubrieron toda una serie de otros genes-reloj, aunque pareciera ser que el mecanismo del reloj de la naturaleza es un poco más complejo que lo sospechado originariamente. Los relojes biológicos en realidad son una red de circuitos diferentes, lo cual hace que el sistema sea robusto y al mismo tiempo sensible, parecido a los modelos informáticos. Que un engranaje no funcione no provoca el detenimiento inmediato de todo el reloj, por el contrario: el reloj también puede volver a ajustarse en caso de interferencias.

PIE DE IMPRENTA

Sociedad Max-Planck, departamento de información y relaciones públicas, Hofgartenstraße 8, 80539 München / e-mail: presse@gv.mpg.de

Redacción: Dra. Christina Beck

Traducción: Astrid Wenzel

Diseño: www.haak-nakat.de

La Versión en español se hizo con el apoyo del DAAD y con fondos del Ministerio de Relaciones Exteriores de Alemania.

DAAD

Deutscher Akademischer Austausch Dienst
Servicio Alemán de Intercambio Académico

explora
Un Programa CONICYT

