

Relojes Moleculares

*Horacio de la Iglesia
Department of Biology
University of Washington
Seattle, WA 98195-1800*

Cronobiología en la calle

El Sr. y la Sra. Defase llevan 27 años casados y constituirían una pareja ejemplar si no fuera por que sus horarios no suelen coincidir. Es más, alguno de sus amigos íntimos asegura que la razón por la que llevan juntos más de un cuarto de siglo es justamente porque sólo conviven durante una a dos horas diarias. La Sra. Defase despierta todos los días entre 4:00 y 4:30 h de la mañana y dedica sus primeras horas a hacer parte de su trabajo como traductora. A las 7:00 h despierta a su hija e hijo para prepararlos para la escuela, les sirve el desayuno y poco antes de las ocho los lleva a la escuela y llega a su oficina a las 8:30 h. Alrededor de las 16:00 h usualmente ya está camino de vuelta a casa. El Sr. Defase se levanta poco después de las 10:30 h cuando ya los niños y su esposa llevan varias horas de actividad. Luego de una hora de despertar forzado a fuerza de aseo y café se dirige a su oficina en la que trabaja como programador. En su oficina sólo trabaja desde el medio día hasta las 17:00 h, hora a la que se suele encaminar a casa. Por la tarde, el matrimonio y sus dos hijos comparten de una a dos horas durante las que tiene lugar la cena. Alrededor de las 7:30 h la Sra. Defase se prepara para ir a dormir y sostiene que ya a las 20:00 h no podría mantenerse en pie, hora a la cual suele estar profundamente dormida. Los niños van a dormir alrededor de las 22:00 h y entre esta hora y las 2:00 h de la mañana es cuando el Sr. Defase aprovecha la quietud nocturna para escribir gran parte de sus programas. El Sr. Defase nunca está dormido antes de las 3:00 h. Los Defase han intentado todo tipo de sacrificios y terapias para lograr estar en sincronía pero todos los intentos que ella ha hecho para volverse más nocturna o él para volverse más diurno resultaron en horribles veladas seguidas de días en los que no podían trabajar eficientemente. Estos intentos de sincronía indefectiblemente terminaban en peleas en las que ella lo acusaba de “murciélago trasnochador” y él a ella de “gallina que despierta aún antes de que salga el sol”. El matrimonio convive serenamente durante los fines de semana entre 11 de la mañana y 7 de la tarde, y ha abandonado todo intento de sincronización mutua porque aseguran que les resulta imposible llevar el horario del otro. Quizá los tranquilizaría saber que el horario al que tan obstinadamente se ajustan no es nada más ni nada menos que una consecuencia de la herencia genética de cada uno. La Sra. Defase es portadora de una mutación en unos de los genes que constituye un engranaje molecular de su reloj circadiano y produce un fenotipo matutino extremo.



El Sr. Defase tiene un polimorfismo en otro de los engranajes moleculares de su reloj que lo vuelve extremadamente nocturno. Ambos pueden conservar una calidad alta de vida, y de relación de pareja, mientras respeten el mandato de sus relojes biológicos y estén activos y reposando cuando el reloj lo dictamina.

CONTENIDOS DE ESTE CAPÍTULO

Introducción

Identificación de los componentes moleculares del reloj

- Componentes de un sistema circadiano: perillas, engranajes y alarmas
- Estrategias para identificar los componentes moleculares del reloj
- Modelos de osciladores moleculares alternativos

La construcción de un reloj intracelular

El reloj molecular de los mamíferos

- Los engranajes
- Ensamblando los engranajes moleculares
- Vías de entrada y salida del reloj molecular
 - Sincronización del reloj molecular por la luz
- Vías de salida del reloj molecular
 - La orquestación de relojes independientes

Bases moleculares de la ritmicidad circadiana en humanos

- Alondras y búhos
- Síndrome de fase avanzada de sueño
- Síndrome de fase retrasada de sueño

Resumen

Lecturas adicionales

Cuestiones de revisión

1. Introducción

Los ritmos circadianos son oscilaciones fisiológicas y comportamentales de períodos cercanos a 24 h que se encuentran sincronizadas con el día solar. La persistencia de estos ritmos en condiciones constantes de laboratorio se interpreta como evidencia de la existencia de un mecanismo endógeno automantenido que genera estos ritmos, es decir un *reloj biológico*. El descubrimiento de los primeros mutantes circadianos en *Drosophila* representó un paso fundamental en la demostración de que la generación de los ritmos circadianos es no sólo endógena sino que tiene un sustrato genético. Es decir, que existen genes específicos, cuya expresión está involucrada en la generación de los ritmos.

En mamíferos, la investigación estuvo dedicada durante varias décadas a identificar el(los) centros neurales en los cuales los relojes o marcapasos circadianos podían estar localizados. Dicha búsqueda trajo como resultado la demostración de que el control maestro de los ritmos circadianos es llevado a cabo por osciladores ubicados dentro del núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo. La localización y especificidad funcional que los ritmos circadianos encuentran en el NSQ es un fenómeno único en el sistema nervioso central, que combinado con la reciente identificación de los componentes moleculares del reloj circadiano crearon un terreno fértil para el crecimiento dramático del conocimiento de las bases celulares y moleculares de la ritmicidad circadiana. El sistema circadiano de mamíferos se ha transformado de esta manera en un sistema ideal para el estudio de las bases neurales de la fisiología y el comportamiento, en el cual fenómenos biológicos que involucran al organismo completo pueden ser asociados a la expresión de unos pocos genes en un pequeño grupo de neuronas anatómicamente identificables.

2. Identificación de los componentes moleculares del reloj

2.1. Componentes de un sistema circadiano: perillas, engranajes y alarmas

La identificación de los componentes básicos de un sistema circadiano (figura 1) es tan importante para el estudio de las bases moleculares de la ritmicidad circadiana como lo es para el estudio del sistema circadiano en todos los niveles de organización. Todo sistema circadiano consta de uno o más osciladores circadianos (los engranajes del reloj), vías de entrada que transmiten información acerca del ciclo ambiental que sincroniza a estos osciladores (las perillas para poner en hora el reloj) y vías de salida por las que los osciladores transmiten su información temporal al resto del organismo y que permiten la expresión de los ritmos fisiológicos y comportamentales (la alarma del reloj, si tomamos el caso específico de un reloj despertador). Si la única salida rítmica que midiéramos en nuestro reloj fuera la alarma que suena cada día a la misma hora y quitáramos la campanilla del despertador podríamos concluir que eliminamos un componente crítico de la maquinaria oscilatoria del reloj. Análogamente, la eliminación de un gen involucrado en la expresión de los ritmos específicos que podemos medir puede hacernos concluir, en forma errónea, que dicho gen es un componente crítico del mecanismo oscilador. ¿Cómo es posible establecer si un gen es un componente esencial del oscilador o si se encuentra en las vías de entrada o de salida? ¿Cuáles son las condiciones para que un gen sea considerado un *gen reloj*? Es decir, un gen cuyos productos están involucrados en la generación de ritmicidad circadiana. La función de un gen está determinada por la función de su producto proteico. Por lo tanto, el gen podrá ser considerado un componente crítico del reloj, si el proceso molecular o bioquímico que depende de su producto proteico es esencial para mantener al reloj oscilando. La eliminación de este gen debería detener la

oscilación y el organismo en cuestión debería tornarse arrítmico. Como veremos, sin embargo, pocos de los genes reloj conocidos han pasado esta estricta prueba cuando se los elimina mediante una mutación nula (*knock out*, KO). No existe, en realidad, una lista mágica de criterios que definan inequívocamente a un componente crítico del reloj. Más aún, se ha sugerido que, dada la complejidad de los sistemas circadianos que se conocen hasta el momento, el concepto de componente crítico del reloj carece de validez. No obstante, definir criterios básicos es sumamente importante para establecer un marco de referencia para la formulación de hipótesis y predicciones con respecto al papel jugado por un gen o un proceso bioquímico en el mantenimiento de la ritmicidad circadiana.

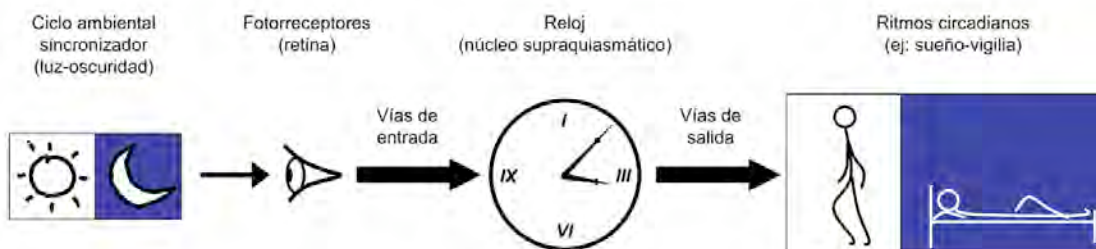


Figura 1. Componentes básicos de todo sistema circadiano. La organización del sistema circadiano en *vías de entrada*, el *reloj* o marcapasos circadiano, y *vías de salida* que permiten la expresión de los ritmos es común a todos los organismos. Esta organización es fundamental para el estudio de sistemas circadianos en todos los niveles de organización, incluyendo el molecular y celular. El ciclo de luz-oscuridad es el sincronizador principal en la mayoría de los organismos. En mamíferos, la información fótica es transducida por la retina, que a su vez transmite esta información al reloj circadiano maestro ubicado en el NSQ. El NSQ transmite su ritmicidad circadiana intrínseca al resto del cerebro y de este modo organiza temporalmente procesos fisiológicos y comportamentales. La presencia de ritmos circadianos tales como el ciclo de sueño-vigilia es el resultado de esta organización temporal.

Históricamente, el supuesto componente del reloj debía mantener él mismo una oscilación circadiana, ya que era considerado una *variable de estado del oscilador*. Esto limitaría los componentes del reloj a aquellas proteínas o genes que directamente forman parte del ciclo de retroalimentación que constituye al reloj (ver abajo). Sin embargo, sólo algunos de los componentes críticos conocidos cumplen con esta condición. Existen varias proteínas cuyos niveles no oscilan y, no obstante, son críticas para el funcionamiento del oscilador.

Un criterio que ha sido tal vez el más útil para discernir entre componentes críticos y vías de salida del reloj, es el criterio de *perturbación*. Este criterio presupone que si se perturba un componente crítico, como por ejemplo la expresión de un gen reloj o la actividad de una proteína reloj, en forma aguda deben observarse cambios en la fase del ritmo medido y si se altera en forma crónica deben observarse cambios en el período. Análogamente, si los niveles o la actividad del componente son mantenidos constantes, el oscilador debería detenerse, lo cual se evidencia con una ausencia de ritmos circadianos en el organismo. Esta predicción debería cumplirse tanto cuando los niveles son mantenidos en valores constantes altos, por ejemplo mediante la sobre-expresión constitutiva de un gen reloj, como cuando son mantenidos en valores constantes bajos, por ejemplo a través de una mutación nula del gen reloj. Las estrategias de genética directa y reversa (ver abajo), que han sido las más prolíficas en identificar componentes del reloj, se basan en el criterio de perturbación. Si bien este criterio continúa siendo el más importante, y con el que cumplen todos los componentes del reloj conocidos hasta el momento, el mismo no permite discernir entre vías de entrada (perillas) y componentes críticos del reloj (engranajes). En principio, cualquier vía de entrada que se altere en forma aguda producirá un cambio en la fase del reloj, y si es afectada en forma crónica puede producir cambios de

fase sucesivos que serán indistinguibles de un cambio en el período. Este problema se complica aún más con el hecho de que algunas de las vías de entrada también oscilan en forma circadiana y pueden ser fácilmente confundidas con variables de estado.

Si el componente crítico del reloj es además una variable de estado del oscilador, los estímulos que inducen cambios de fase de los ritmos, tales como pulsos de luz o tratamientos farmacológicos específicos, deben producir cambios en los niveles o la actividad del componente crítico.

Otro criterio que ha sido particularmente útil en mamíferos es el análisis de la *expresión in vivo*. Dado el conocido papel del NSQ de marcapasos maestro en mamíferos, es natural presuponer que los genes cuya expresión es crítica para la generación de ritmicidad circadiana deban expresarse en el NSQ. Los genes reloj identificados en mamíferos, de hecho, tienen alto nivel de expresión en el NSQ. El análisis de la expresión de genes reloj *in vivo* ha permitido identificar, además, osciladores circadianos en otras áreas del sistema nervioso, así como en tejidos periféricos.

Finalmente, dado que los componentes y procesos bioquímicos que constituyen los relojes moleculares de varias especies comienzan a ser entendidos, un nuevo criterio a añadir a los anteriores es el de establecer el papel que el supuesto componente tiene en el oscilador molecular ya conocido. Esto no descarta que puedan identificarse componentes de nuevos relojes moleculares. No obstante, hasta el momento todos los componentes de osciladores circadianos identificados en cada especie parecen interactuar directa o indirectamente como engranajes del mismo reloj. Es importante destacar que muy pocos genes reloj han sido sometidos a este criterio en estudios *in vivo*. En la mayoría de los casos la interacción entre los componentes moleculares del reloj, y los procesos moleculares y bioquímicos que lo constituyen, han sido establecidos en sistemas *in vitro* y en muchos casos en cultivos de células diferentes de las presentes en el reloj central. En estos sistemas *in vitro*, los componentes moleculares no necesariamente exhiben el mismo comportamiento que *in vivo*.

2.2. Estrategias para identificar componentes moleculares del reloj

El diseño básico de todo sistema circadiano en sus componentes de vías de entrada, reloj y vías de salida, dio lugar a dos estrategias para intentar identificar componentes esenciales del reloj. La primera consistió en determinar cuál es la vía de entrada por la cual se sincroniza al reloj y luego seguir esa vía corriente abajo hasta, eventualmente, llegar al mecanismo de oscilación propiamente dicho. La segunda consistió en identificar una vía de salida del reloj que controla un ritmo determinado y estudiar la regulación de esta vía de salida corriente arriba hasta que eventualmente se llegará a los componentes del reloj que controlan dicha vía de salida, y al mecanismo oscilador. Si bien es lógico pensar que las perillas del reloj estén de alguna manera conectadas a los engranajes del reloj, y a su vez estos estén conectados con la campanilla de la alarma del reloj, ninguna de estas dos estrategias ha sido muy fructífera en la identificación de los mecanismos que constituyen al oscilador circadiano en mamíferos y otros animales. No obstante, ambas estrategias permitieron dilucidar algunos de los procesos biológicos responsables de la sincronización de osciladores circadianos e involucrados en las vías de salida del reloj.

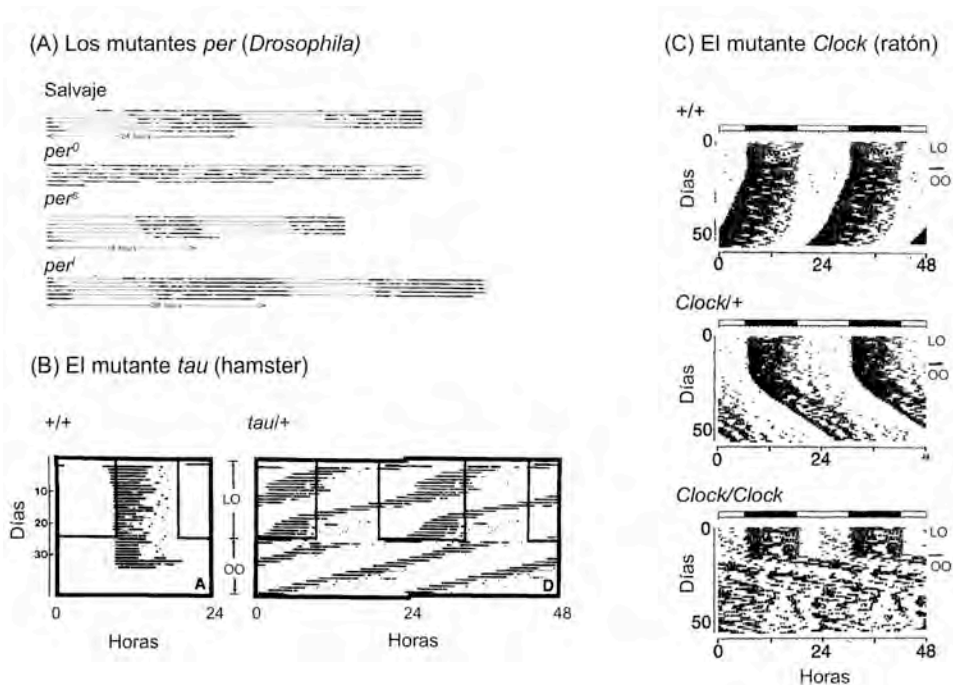


Figura 2. La estrategia de la genética directa ha identificado mutaciones en genes que constituyen componentes moleculares del reloj circadiano de diferentes organismos. A. Actogramas de una mosca de genotipo salvaje y tres moscas con mutaciones en el locus *per*, obtenidas a partir de una estrategia de mutagénesis inducida. A diferencia de la mosca de genotipo salvaje, los mutantes per^0 , per^s (short) y per^l (long) presentan arritmicidad circadiana, período circadiano corto (~19 h) y período circadiano largo (~28 h), respectivamente. B. Actograma de un hámster de genotipo salvaje y un heterocigoto para la mutación *tau*, identificada como una mutación espontánea en una colonia de hámsters de genotipo salvaje. Los períodos circadianos de los genotipos salvaje, heterocigoto ($tau/+$) y homocigoto (no mostrado) son de aproximadamente 24, 22 y 20 h, respectivamente. C. Actogramas de un ratón de genotipo salvaje ($+/+$), un heterocigoto ($Clock/+$) y un homocigoto ($Clock/Clock$) para la mutación *Clock*, identificada a partir de una estrategia de mutagénesis inducida. El genotipo salvaje y el heterocigoto presentan períodos de aproximadamente 23,5 y 25 h, respectivamente. El homocigoto *Clock* presenta un período circadiano inicial de 27,5 horas y se torna arrítmico después de varios días en oscuridad constante. LO: Luz-oscuridad; OO: oscuridad constante.

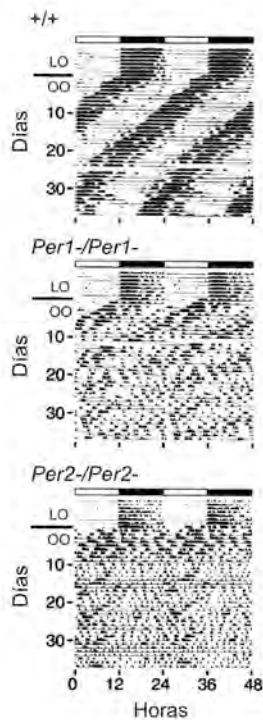


Figura 3. La estrategia de la genética reversa en el ratón ha permitido caracterizar la función de componentes moleculares del reloj en mamíferos. Actogramas de un ratón de genotipo salvaje (+/+), un homocigoto para una mutación nula en el gen *Per1* (*Per1-/Per1-*) y un homocigoto para una delección en el gen *Per2* (*Per2-/Per2-*). Los mutantes

Una aproximación experimental que ha sido más prolífica se ha basado en el criterio de perturbación y en la alteración directa del mecanismo oscilador mediante herramientas farmacológicas, tales como la inhibición de la síntesis de proteínas, o genéticas, tales como la eliminación o mutación de genes específicos. No obstante, un cambio en el fenotipo circadiano frente a una perturbación debe ser interpretado con cautela y no siempre indica la alteración de un componente crítico del reloj. Dentro de las estrategias para perturbar el mecanismo oscilador tanto la estrategia de la *genética directa* como la de la *genética reversa* han tenido gran éxito en la identificación de componentes moleculares críticos del reloj.

En la estrategia de genética directa se avanza del fenotipo hacia el genotipo. Es decir, se identifican fenotipos circadianos atípicos y mediante cruzamientos se establece si dicho fenotipo tiene una base genética y cuál es el tipo de mutación que lo genera. Las mutaciones pueden ser espontáneas como en el caso de del mutante *tau* (ver Cuadro de Especial Interés) del hamster o pueden ser inducidas con agentes mutagénicos como en el caso de los mutantes del gen *period* (*per*) en *Drosophila* o el gen *Clock* en el ratón (figura 2). Una vez caracterizados los mutantes, existen estrategias de mapeo genético y físico para identificar y secuenciar los genes mutados, y estrategias moleculares y bioquímicas para establecer el patrón de expresión de estos genes y su función. Esta estrategia es particularmente valiosa para identificar nuevos componentes, ya que se basa en el efecto que la mutación de genes al azar tiene en el fenotipo del organismo, sin hacer ninguna presuposición acerca de la función específica de los genes. La principal desventaja de esta técnica es

que la detección de mutaciones recesivas requiere muchos cruzamientos.

En la estrategia de la genética reversa se avanza del genotipo hacia el fenotipo. En otras palabras, se altera, mediante técnicas de ingeniería genética, la expresión de genes específicos cuya función se sospecha puede estar involucrada en el mecanismo oscilador del reloj. Una variedad de técnicas pueden utilizarse para no sólo abolir la expresión de un gen, como en caso de los KOs, sino también para sobrexpresarse un gen específico o una variante mutante del gen. Este tipo de abordaje ha sido muy poderoso para identificar componentes del reloj en el ratón, tales como los genes de la familia *Per* (*Per1*, *Per2*) (figura 3) y de los criptocromos (*Cry1* y *Cry2*).

Para la aplicación de técnicas de genética reversa es importante tener genes candidatos. Con este objeto, se utilizan técnicas de *expresión génica diferencial*, tales como el "display diferencial" o los *microarreglos* que permiten identificar genes nuevos cuya expresión varía en forma circadiana. Ambas técnicas se basan en el supuesto de que los genes reloj muestran ritmos de expresión. El display diferencial compara DNA complementario (cDNA) sintetizado a partir de ARNm extraído a diferentes horas del ciclo circadiano. Aquellos genes cuya transcripción varía en forma circadiana generarán diferentes especies de cDNA. Estos cDNAs pueden ser clonados y secuenciados, y la identidad de los genes que les dio origen determinada. La técnica de microarreglos también estudia las diferencias

entre el cDNA proveniente de ARNm extraído a diferentes horas, pero en este caso se determinan los niveles relativos de cDNA específico de cada uno de miles de genes ya conocidos. Ambas técnicas detectarán cualquier gen cuya transcripción oscile en forma circadiana, incluyendo genes que constituyen genes reloj pero cuya transcripción se encuentra bajo control circadiano. Otra fuente de genes candidatos ha sido la homología de secuencias entre diferentes especies de animales. La alta conservación de función entre genes de la misma familia en organismos diversos como *Drosophila* y mamíferos ha permitido aislar genes homólogos en decenas de especies de mamíferos.

Tanto las técnicas de genética directa como reversa presentan la limitación de que aunque una mutación específica, inducida por el método que fuere, no tenga un efecto en el fenotipo circadiano, no implica que el gen mutado no sea un componente crítico del reloj.

Cuadro de especial interés.

La clasificación y nomenclatura actual de los genes en distintas especies nos recuerda la clasificación de los animales en el *Emporio celestial de conocimientos benévolo*s (Borges, 1951), en el que se clasifican a los animales en: (a) *pertenecientes al Emperador*, (b) *embalsamados*, (c) *amaestrados*, (d) *lechones*, (e) *sirenas*, (f) *fabulosos*, (g) *perros sueltos*, (h) *incluidos en esta clasificación*, (i) *que se agitan como locos*, (j) *innumerables*, (k) *dibujados con un pincel finísimo de pelo de camello*, (l) *etcétera*, (m) *que acaban de romper el jarrón*, (n) *que de lejos parecen moscas*. El nombre de los genes puede referirse a su función, o bien a la carencia de función en el primer mutante identificado. Algunos de los nombres se abrevian con las primeras tres letras del nombre completo del gen, mientras que otros se abrevian con las siglas de la proteína para la que codifican. Algunos genes con función prácticamente idéntica en especies diferentes llevan distinto nombre, y otros con funciones diferentes llevan el mismo nombre! A algunos miembros de la misma familia de genes se los distingue entre sí agregándole al nombre del gen un número, a los de otras familias agregándoles letras griegas y a los de otras agregándoles letras mayúsculas. En general, cuando nos referimos a genes de mamíferos, la primer letra del gen es mayúscula, mientras que en *Drosophila*, todas las letras son minúsculas... No obstante, abundan las excepciones. A pesar de estas arbitrariedades, en este capítulo, en honor a Jorge Luis Borges, mantendremos la nomenclatura comúnmente utilizada en el campo de la genética y de los ritmos circadianos. Nos referiremos a los genes de *Drosophila* en letra minúscula y a los de mamíferos con la primer letra en mayúscula, sin distinguir la especie a la que pertenece a menos que sea necesario. En todos los casos nos referiremos a las proteínas con todas las letras en mayúscula.

Esto se debe a que cuando el producto de un gen está ausente o modificado a lo largo del desarrollo de un individuo, otro gen puede adoptar la función del gen mutado. Estos mecanismos compensatorios pueden ocultar la verdadera función del gen mutado. Además, existe cierta redundancia en el papel de algunos de los genes reloj. Este parece ser el caso entre genes parálogos, es decir genes que sufrieron duplicaciones en determinados grupos filogenéticos tales como mamíferos. Ejemplos de los mismos son los gen *Per* (*Per1* y *Per2*) y los criptocromos (*Cry1* y *Cry2*), cuyas mutaciones sólo tienen el efecto de pérdida inmediata de la ritmicidad en oscuridad constante cuando ambos miembros de la familia del gen están ausentes. Por el contrario, alteraciones en la expresión de un gen pueden tener efectos pleiotrópicos que afecten el fenotipo circadiano pero que no necesariamente afecten el mecanismo

oscilatorio del reloj. Es por estas razones que la alteración de la expresión de genes en forma inducible, en que se puede controlar el momento y el tejido específico en que se alterará la expresión del gen será necesaria para establecer de forma definitiva el papel específico de algunos genes en el mecanismo de oscilación circadiana.

A pesar de estas limitaciones, ambos planteamientos han sido extremadamente prolíficos, y los falsos positivos han sido llamativamente escasos. Es decir, el número de mutaciones que han producido efectos robustos en el fenotipo circadiano, tales como cambios importantes en el período circadiano o la abolición completa de la ritmicidad, es relativamente bajo, y muchas de estas mutaciones han conducido al clonado y caracterización de auténticos genes reloj.

2.3. Modelos de osciladores moleculares alternativos

La caracterización de los primeros mutantes circadianos en *Drosophila* y más tarde en el hongo *Neurospora* y en mamíferos estableció claramente que la generación de los ritmos circadianos tiene un sustrato innato y genético. Sin embargo, estos descubrimientos no permitieron dilucidar la función que los genes involucrados tenían. Durante décadas se desconocía de qué forma los productos de genes específicos podían mantener una oscilación circadiana. Cualquier modelo válido de la función de estos genes debía contemplar las propiedades básicas de cualquier oscilador circadiano, esto es: ser capaz de oscilar en forma automantenida, ser susceptible a cambios de fase por estímulos sincronizadores específicos (o por señales que transducen estos estímulos) y presentar compensación de su período frente a cambios de temperatura. Algunos modelos postulaban que la oscilación era una propiedad emergente de un tejido cuyas células, por lo general neuronas, en sí no eran osciladores autónomos unicelulares. En estos modelos, las mutaciones circadianas no necesariamente debían afectar procesos intracelulares sino que podían modificar la comunicación entre células dentro del oscilador. Si bien las propiedades emergentes del tejido oscilador son sumamente importantes en la expresión de los ritmos, la capacidad de oscilar en forma automantenida en todos los relojes circadianos descritos hasta el momento no depende de dichas propiedades emergentes.

Los modelos alternativos postulaban que el mecanismo oscilatorio básico era un proceso intracelular. Varios hallazgos experimentales sugerían la validez de estos modelos. Primero, los ritmos circadianos están presentes no sólo en organismos con sistemas nerviosos complejos sino también en organismos simples, incluyendo unicelulares. Segundo, en las células basales de la retina del molusco del género *Bulla* se puede registrar un ritmo circadiano de conductancia de membrana en células cultivadas en aislamiento. Finalmente, células del NSQ cultivadas en dispersión se comportan como osciladores unicelulares independientes que presentan un ritmo circadiano en frecuencia de potenciales de acción con períodos que son característicos de cada célula.

Diferentes mecanismos oscilatorios subcelulares fueron propuestos. Algunos modelos proponían una secuencia de genes cuya transcripción y traducción dependía del producto del gen anterior en la secuencia, con el producto del último gen en la secuencia influenciando la expresión del primero. Otros modelos proponían un mecanismo de retroalimentación que involucraba cambios en la permeabilidad de la membrana celular. Finalmente, otros modelos se basaban en ciclos biosintéticos que involucraban distintas vías metabólicas y mecanismos de retroalimentación. Si bien ninguno de estos modelos constituye la base del mecanismo oscilatorio de los relojes estudiados hasta el momento, todos ellos proponían mecanismos de retroalimentación, los cuales constituyen una parte clave de todos los osciladores moleculares que se conocen.

3. La construcción de un reloj intracelular

Todos los osciladores circadianos conocidos hasta el momento se basan en ciclos de retroalimentación que se encuentran dentro de la célula y no requieren de interacciones intercelulares para mantener la oscilación. En principio, un ciclo de retroalimentación negativa que involucre la transcripción y traducción de un gen, y la inhibición de la transcripción por el propio producto proteico (el *elemento negativo*), bastaría para producir oscilaciones iniciales en los niveles de la proteína (figura 4.A). Sin embargo, un sistema como éste produciría una oscilación que no necesariamente tendría un período cercano a 24 h, y además, los niveles de proteína alcanzarían niveles constantes bajos rápidamente. Otra condición para que los niveles oscilen, y lo hagan con un período cercano a 24 h, es que

exista un retraso entre el momento en que se traduce la proteína y el momento en que ésta inhibe la transcripción

(figura 4.B). Este retraso puede producirse mediante la existencia de umbrales en los niveles de proteína para que esta sea capaz de inhibir la transcripción, o bien mediante la presencia de otros factores que deban asociarse con la proteína para que esta pueda ejercer su inhibición. Tal sistema, produciría oscilaciones iniciales de aproximadamente 24 h. Sin embargo sin una inducción activa de la transcripción del gen, dichas oscilaciones también tenderían a ser reducidas en amplitud y los niveles de proteína a ser bajos. Un segundo elemento, un *elemento positivo*, es necesario para mantener oscilaciones de elevada amplitud (figura 4.C). El elemento positivo constituirá la fuerza motriz del oscilador, sin la cual las oscilaciones serán de baja amplitud y los niveles de la proteína que actúa como elemento negativo serán bajos. Como veremos, los osciladores conocidos hasta el momento cuentan con varios elementos negativos y positivos, los cuales además interactúan en más de un ciclo de retroalimentación. Finalmente, cualquiera sea el ciclo de retroalimentación, deben existir vías de sincronización que puedan cambiar la fase del mismo, y vías que comuniquen al reloj con los procesos celulares que se encuentran bajo su control.

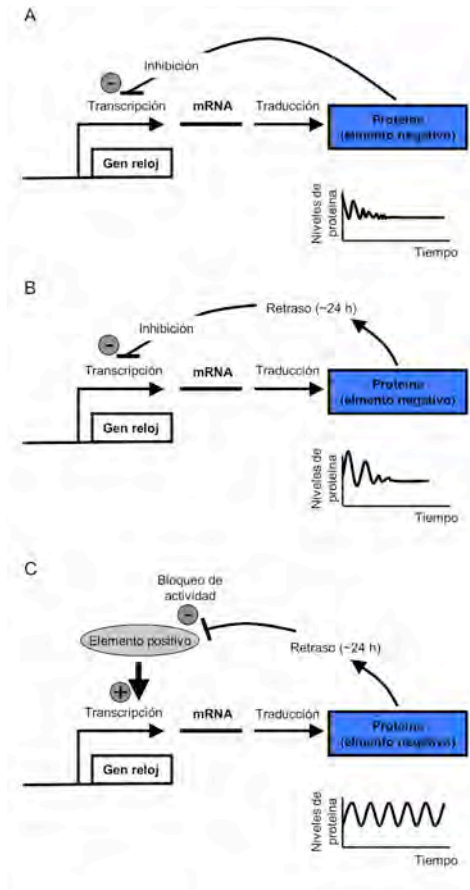


Figura 4. Osciladores moleculares basados en ciclos de retroalimentación que involucran transcripción y traducción. A. El producto proteico del gen reloj es el elemento negativo que inhibe su propia transcripción. Este tipo de ciclo podría originar una oscilación inicial en los niveles proteína. Dicha oscilación no necesariamente tendría un período cercano a 24 h y los niveles de proteína tenderían a alcanzar un valor bajo constante. B. El producto proteico del gen reloj inhibe su propia transcripción pero existe un retraso de aproximadamente 24 h entre la síntesis proteica y la inhibición que esta ejerce en la transcripción. Este tipo de ciclo puede originar una oscilación inicial con períodos cercanos a 24 h pero los niveles de proteína tenderían a alcanzar un valor constante. C. El producto proteico del gen inhibe su propia transcripción con un retraso pero además existe un elemento positivo (por ejemplo otra proteína) que activa la transcripción del gen. Este tipo de ciclo, con elementos positivos y negativos, origina una oscilación mantenida con período cercano a 24 h.

4. El reloj molecular de los mamíferos

4.1. Los engranajes

La sucesión de hallazgos que llevaron a identificar los componentes y procesos moleculares básicos del reloj circadiano de mamíferos y, simultáneamente, del reloj circadiano de *Drosophila*, representaron una explosión en el conocimiento de las bases moleculares de la ritmicidad circadiana. La elucidación de los mecanismos básicos en los que se basa el funcionamiento de estos osciladores en menos de 10 años constituyó un evento histórico no sólo dentro de la cronobiología sino también dentro de las neurociencias en general. Si tuviéramos que establecer cual

fue el desencadenante inicial para esta serie de descubrimientos, tal vez la identificación de los mutantes *per* de *Drosophila* por Konopka y Benzer se encuentre entre los descubrimientos más importantes. Estos mutantes establecieron no sólo que la ritmicidad circadiana tiene un sustrato genético, sino que constituyeron la primera evidencia de que mutaciones puntuales pueden modificar el comportamiento de un animal. El primer mutante circadiano en mamíferos no fue descubierto hasta casi 20 años más tarde en hámsters, cuando la mutación *tau* fue caracterizada a partir de un animal cuya fase circadiana era atípica. Los heterocigotos para dicha mutación presentaban un período circadiano más corto (de aproximadamente 22 h) que los animales de genotipo salvaje, y los homocigotos *tau* presentaban un período de aproximadamente 20 h.

La identificación de estos mutantes, y más tarde el clonado del gen *per* en *Drosophila*, no permitieron sin embargo definir la función del mismo en el reloj molecular. La identificación de mutantes del gen *Clock* en ratones constituyó un paso esencial para establecer la función no sólo de la proteína CLOCK sino también del resto de los componentes del reloj de mamíferos y de *Drosophila*. Varias características del gen *Clock* lo hacen un buen candidato a gen reloj. *Clock* es una mutación semidominante que produce un período circadiano más largo en heterocigotos y uno aún más largo, seguido de arritmicidad tras varios días en oscuridad constante, en homocigotos. El gen tiene elevado grado de expresión en el NSQ, si bien se expresa en otras áreas del cerebro. Finalmente, el fenotipo de los mutantes *Clock* puede ser revertido en animales transgénicos mediante complementación con cromosomas bacterianos artificiales que contienen al gen *Clock* salvaje.

El siguiente gen reloj clonado en mamíferos fue *Per1*, clonado simultáneamente por dos grupos independientes. Sun y colaboradores descubrieron el gen en una biblioteca de cDNA humano e infirieron su función de gen reloj por su homología al gen *per* de *Drosophila*. Tei y colaboradores obtuvieron el gen a partir de PCR de DNA genómico utilizando "primers" basados en la secuencia del gen *per* de *Drosophila*. La expresión de *Per1* presenta una oscilación circadiana en el NSQ. El clonado de *Per1* fue seguido por el clonado de *Per2* y *Per3*, dos genes de la misma familia, los cuales fueron identificados mediante búsqueda en bases de datos, basándose en la homología que los mismos presentan con *mPer1*. Al igual que *mPer1*, los niveles de estos dos genes oscilan en forma circadiana en el NSQ, con un pico durante la fotofase o día subjetivo (figura 5.C). Una delección del gen *Per2* produce, en homocigotas, un acortamiento en el período circadiano seguido de arritmicidad en oscuridad constante. Una mutación nula en el gen *Per1* produce un acortamiento leve en el período circadiano, y si bien no produce un fenotipo arrítmico en oscuridad constante, el fenotipo arrítmico de los mutantes dobles *Per1/Per2* es mucho más dramático que el de los mutantes para la delección de *Per2* solamente. Estudios con otros mutantes con delecciones de los genes *Per1* y *Per2* indican una tendencia a la arritmicidad mayor mutantes de cada gen individual (figura 3). No obstante, todas las evidencias parecen indicar que *Per1* y *Per2* constituyen componentes legítimos del reloj. *Per3*, sin embargo, no parece ser un componente del reloj molecular de mamíferos.

El descubrimiento del papel de los criptocromos (*Cry1* y *Cry2*) en el reloj molecular de mamíferos fue un tanto sorprendente, ya que la proteína CRY en *Drosophila* funciona como fotorreceptor para el sistema circadiano. Sin embargo, varios estudios indicaron que en mamíferos, estas proteínas, homólogas de las fotoliasas reparadoras de DNA, no poseen un papel aparente en la fotorrecepción circadiana sino que forman parte del reloj molecular. Los criptocromos se expresan en el NSQ y la ausencia de *Cry1* o *Cry2* producen un acortamiento y un alargamiento del período circadiano, respectivamente. Finalmente, la eliminación simultánea de ambos genes produce una pérdida completa de la ritmicidad circadiana en oscuridad constante. Estos resultados sugieren que si bien ambos genes son genes reloj, los mismos parecen tener funciones redundantes.

Tal vez el KO con fenotipo más dramático es el del gen *BMAL1* (también conocido como *Mop3*), que muestra una pérdida inmediata y completa de la ritmicidad en oscuridad constante.

4.2. Ensamblando los engranajes moleculares

Los mutantes descritos arriba caracterizaron genes cuyas mutaciones inducen cambios en el fenotipo circadiano. Volviendo a nuestra analogía de perillas, engranajes y alarmas, si introdujéramos un destornillador en los engranajes de un reloj y a partir de ese momento el mismo empezara a atrasar o adelantar, es intuitivo concluir que perturbamos el mecanismo oscilatorio. Del mismo modo, si tras nuestra perturbación, la alarma del reloj comienza a sonar al azar durante el día y la noche, podríamos concluir que alteramos la maquinaria oscilatoria. La conclusión bien puede ser correcta, pero nuestra burda perturbación no nos dice nada acerca de cómo funciona el engranaje dañado por el destornillador, aún si podemos identificarlo, aislarlo y determinar como fue dañado. Las mutaciones al azar o dirigidas son equivalentes a nuestro destornillador en cuanto a que no nos dicen nada acerca de la función del gen el mecanismo oscilador, aún después de que este fue identificado, clonado y la mutación caracterizada. Para conocer la función del engranaje debemos establecer cómo y con qué otros engranajes interactúa, y cómo modificó nuestra perturbación su interacción con el resto de los engranajes.

En el mundo de los relojes biológicos, los engranajes se estudian mediante métodos moleculares y bioquímicos. El análisis de secuencia de los genes involucrados es el primer paso para aproximarse a la función del gen. Así como los engranajes deben tener dientes que encastran unos con otros, las proteínas reloj tienen dominios funcionales que les permiten interactuar con otras proteínas reloj específicas o con secuencias particulares de DNA. El clonado del gen *Clock*, que representó el primer gen reloj clonado en mamíferos, y su secuenciación mostró que la proteína CLOCK posee los dominios funcionales “basic-Helix-Loop-Helix” (bHLH) y el dominio PAS, cuyo nombre deriva de tres proteínas que lo comparten (PER, ARNT y SIM). Estos dominios confieren a CLOCK la capacidad de ligarse a DNA y de dimerización con otras proteínas, respectivamente. La combinación de ambos dominios, además, ubica a CLOCK en la familia de los factores de transcripción bHLH-PAS. La revelación de estos dominios funcionales sugirió que el control de la transcripción de genes específicos y la dimerización con otras proteínas constituirían procesos claves en el mecanismo oscilatorio del reloj. Paralelamente al clonado de *Clock*, el análisis de la expresión de *per* en *Drosophila*, y en particular de su promotor, identificó una secuencia consenso CACGTG, denominada caja E (“E-box”), requerida para la activación transcripcional de *per*, y que representa un sitio de unión a DNA altamente específico para proteínas con dominios bHLH. La identificación de CLOCK como una proteína bHLH-PAS y la caracterización de la caja E en el promotor del gen *per* sugirió por primera vez que la expresión de estos dos genes reloj podía estar ligada.

Al clonado de *Clock* siguió el clonado de *Per1* y *Per2* en mamíferos y la confirmación de que PER1 y PER2, como PER en *Drosophila*, también poseen un dominio PAS que les confiere capacidad de dimerizar con otras proteínas con este dominio. Los engranajes del reloj de mamíferos no fueron ensamblados hasta que se estableció una clara conexión entre las funciones de CLOCK y de las proteínas PER. En un estudio de doble hibridación en levaduras, que permite la búsqueda de compañeros de dimerización de una proteína conocida, Gekakis y colaboradores identificaron un compañero de dimerización de CLOCK conocido como BMAL1. Los autores demostraron que esta proteína no sólo dimeriza con alta especificidad con CLOCK sino que el dímero tiene la capacidad de activar la transcripción del gen *Per1*, siempre y cuando este promotor contenga una caja E funcional. La proteína CLOCK mutante identificada previamente también tiene la capacidad de dimerizar con BMAL1 y de ligarse a

la caja E, pero carece la capacidad de activar la transcripción de *Per1*. Este descubrimiento permitió por primera vez conectar a los genes *Clock* y *Per*, y constituyó el primer paso para la caracterización del ciclo molecular del reloj de mamíferos (figura 5). Más tarde se identificaron los criptocromos (*Cry1* y *Cry2*) y se determinó que los mismos son en realidad componentes del reloj. Las proteínas CRY1 y CRY2 tienen la capacidad de formar multímeros con las proteínas PER1 y PER2 y estos complejos proteicos pueden translocar al núcleo celular, donde inhiben la activación de la transcripción ejercida por el dímero CLOCK-BMAL1. Esto identifica a los criptocromos y a las proteínas PER como elementos negativos del ciclo molecular (figuras 4 y 5), ya que los mismos inhiben su propia transcripción a través de la inhibición de CLOCK-BMAL1. Dado que existe cierto retraso en la translocación de los multímeros, la inhibición de la activación de la transcripción mediada por CLOCK-BMAL1 produce una oscilación circadiana en los niveles de los ARNm y proteínas de los genes *Per* y *Cry* (Figura 5.B).

Con el ciclo construido hasta el momento, existiría una oscilación de los elementos negativos pero no de los positivos. De hecho, los niveles de ARNm de *Clock* no varían en el NSQ. Sin embargo el ARNm de *BMAL1* muestra una oscilación robusta en antifase a aquella de *Per* y *Cry* (Figura 5.B). El pico en los niveles de ARNm de *BMAL1* coincide con el pico en los niveles de proteínas PER y CRY, lo cual sugiere que las mismas podrían inducir la transcripción de *BMAL1*. El análisis de expresión en mutantes y de ensayos moleculares *in vitro* indica que PER2 en asociación con los criptocromos tiene la capacidad de activar la transcripción de *BMAL1*. Esta activación no es aparentemente directa sino a través de REV-ERB α , un receptor nuclear huérfano (denominado así porque carece de un ligando conocido). El modelo corriente (Figura 5.A) propone que REV-ERB α inhibe la transcripción de *BMAL1*. A su vez, la transcripción de *Rev-erb α* es inhibida por las proteínas PER y CRY pero activada por CLOCK-BMAL1. Esto produce una acumulación cíclica de REV-ERB α y, por lo tanto, una inhibición cíclica de la transcripción de *Bmal1*. El resultado es que el ARNm de *Bmal1* no sólo oscila sino que lo hace en antifase a los genes *Per* y *Cry*. REV-ERB α constituye un nexo más entre los elementos negativos y positivos del ciclo molecular. Esto significa que el funcionamiento del reloj molecular de mamíferos depende de dos ciclos que involucran transcripción y traducción, que a su vez están interconectados de manera que maximizan la amplitud de las oscilaciones. Esta interconexión de dos ciclos parece estar conservada evolutivamente y está presente en el reloj molecular de *Drosophila*, el pez cebra e incluso el reloj del hongo *Neurospora*.

El ciclo de retroalimentación descrito en la Figura 5.A destaca la importancia de las oscilaciones en los niveles de transcripción para mantener la oscilación en los componentes del reloj. No obstante, nada en el esquema de la figura indica que este ciclo oscilará con un período cercano a 24 h. Como hemos indicado arriba, debe existir cierto retraso en uno o más de los pasos que garantice que el ciclo dure aproximadamente 24 h. Dado que la función de un gen está dada por la función de su proteína madura, existen dos procesos básicos mediante los cuales se puede regular la disponibilidad del producto maduro del gen. Las *modificaciones posttranscripcionales* determinarán la naturaleza, la disponibilidad y la vida media del ARNm necesario para la síntesis de la proteína. La *modificaciones posttraduccionales* determinarán, en general, si la proteína será o no funcional. Ambos procesos son fundamentales en la regulación del período de todos los relojes moleculares y, en algunos casos, incluso pueden determinar la presencia de ritmicidad aún en ausencia de transcripción rítmica. En principio, podríamos concebir un reloj cuyos componentes moleculares presenten una tasa de transcripción constante pero una oscilación funcional debido a modificaciones posttranscripcionales y/o posttraduccionales.

Poco se sabe acerca de modificaciones posttranscripcionales esenciales para la función del reloj molecular de mamíferos. Es importante destacar que la medición de los niveles de ARNm de un gen por técnicas como la

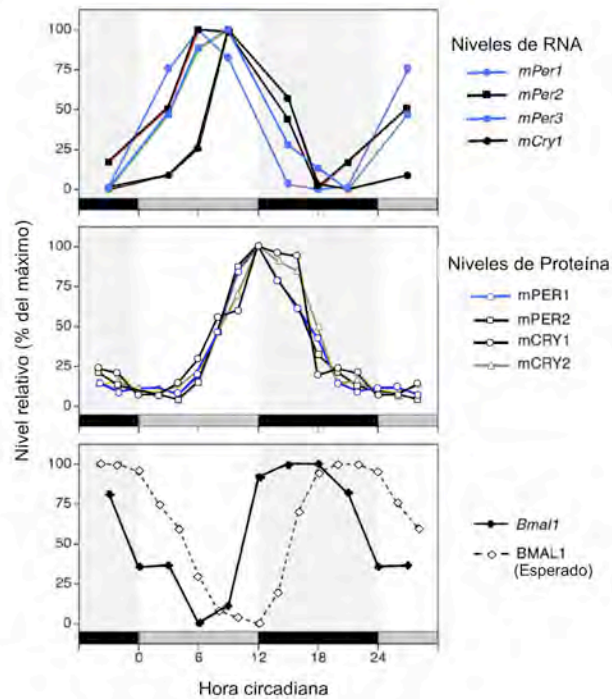
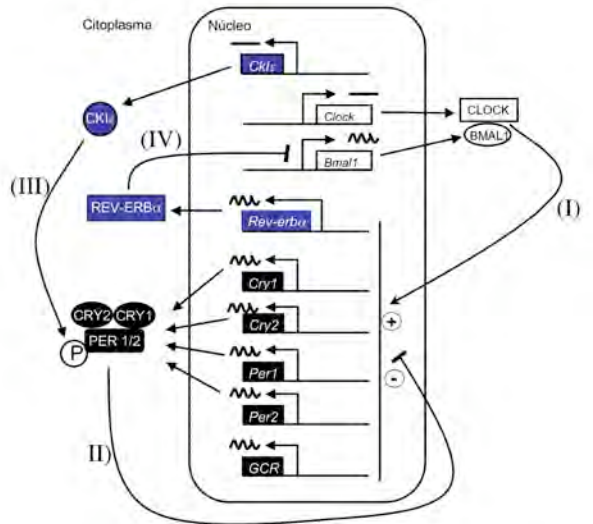


Figura 5. El reloj molecular de mamíferos. A. El modelo corriente propone que: El dímero entre las proteínas CLOCK y BMAL1 (elementos positivos) activan la transcripción de los genes *Per* y *Cry* (I); las proteínas CRY y PER (elementos negativos) forman multímeros que translocan al núcleo e inhiben la activación de la transcripción inducida por CLOCK-BMAL1 (II); la retroalimentación negativa de las proteínas CRY y PER sobre la transcripción de sus propios genes es retrasada por la fosforilación de las proteínas PER por la acción de CKI ϵ (III); la transcripción de *Rev-erb α* es también activada por CLOCK-BMAL1 e inhibida por el complejo PER-CRY, produciendo una oscilación en los niveles de REV-ERB α , una proteína que, a su vez, inhibe la transcripción de *Bmal1* (IV). El resultado de estos ciclos de retroalimentación es la oscilación en los niveles de ARNm y proteínas de varios de los genes reloj y de genes controlados por el reloj (GCR). B. La interacción entre los elementos positivos y negativos conduce a la oscilación circadiana en los niveles de RNAm y proteína de varios de los genes reloj, con picos de expresión específicos para cada gen. Ver texto para más detalles.

hibridación *in situ* o el análisis por “*northern blot*” no refleja la tasa de síntesis de ARNm sino el balance entre la tasa de síntesis y la tasa de degradación del mismo. El incremento de los niveles de ARNm de un gen específico ante un tratamiento o a una hora del día puede indicar un incremento en la tasa de transcripción del gen o bien un decremento en la tasa de degradación del ARNm. Existen tres procesos posttranscripcionales claves que determinan el tipo de ARNm que estará disponible para la traducción y su vida media. La transcripción del gen origina un transcripto primario, también conocido como RNA heteronuclear (RNAhn), debido a que el mismo contiene tanto intrones como exones. Apenas comienza la síntesis del RNAhn se produce el *encapuchado* del extremo 5' y luego la eliminación de intrones o “*splicing*”. Este último proceso puede producir variantes diferentes de ARNm maduro, dependiendo de qué exones se conservan, mediante el proceso de *splicing alternativo*. Finalmente, mediante el proceso de *poliadenilación*, se le agrega una cola de adeninas (poliA) al extremo 3' del ARNm. Estas tres modificaciones están interrelacionadas y afectan directamente procesos como el transporte del ARNm al citoplasma, su disponibilidad para la traducción, y su vida media. Hasta el momento no se sabe si el encapuchado del ARNm de genes reloj juega algún papel en la determinación de la tasa de traducción de dichos genes. Por otro lado, tanto el *splicing* alternativo de algunos genes reloj (*Per* en *Drosophila* y *Bmal1* en ratón) como la modificación de la longitud de la cola poliA son procesos importantes que regulan la expresión de los genes reloj. Un caso particularmente interesante es el del gen de la vasopresina en el NSQ, cuya expresión esta controlada por el reloj circadiano molecular. El ARNm que codifica para este péptido, no sólo está regulado en forma circadiana a nivel de la transcripción, sino que también la longitud de su cola poliA está regulada en forma circadiana, lo cual determina un ritmo en la estabilidad del ARNm maduro.

Las modificaciones posttraduccionales son sumamente importantes para determinar la función de una proteína, y tanto en el reloj de *Drosophila* como en el de mamíferos se ha demostrado que la actividad de genes cuyos productos modifican posttraduccionamente proteínas reloj son esenciales para el funcionamiento del oscilador molecular. Estos genes y proteínas constituyen un ejemplo muy claro de componentes del reloj que no se encuentran involucrados directamente en el ciclo de retroalimentación, es decir que no son variables de estado del oscilador, y sin embargo son esenciales para el funcionamiento adecuado del reloj. Entre las modificaciones posttraduccionales más comunes se encuentran la metilación, la acetilación, la glicosilación y la fosforilación. La fosforilación es sin duda la modificación posttraducciona que cuenta con más evidencias de ser esencial para el funcionamiento del reloj. En mamíferos esto quedó claramente demostrado cuando se caracterizó la mutación *tau* en el hámster. El gen mutado codifica para la caseína quinasa I ϵ (CKI ϵ), la cual fosforila a las proteínas PER (Figura 5). La mutación *tau* produce una proteína con actividad de fosforilación reducida, lo cual aumenta la estabilidad de las proteínas PER y hace que estas sean internalizadas al núcleo más rápidamente, acortando la duración del ciclo circadiano. Otra proteína de la familia, la caseína quinasa CKI δ , también posee actividad fosforiladora de las proteínas Per y ha sido propuesta como otro importante modulador posttraducciona de las proteínas reloj, con un rol similar y redundante al de CKI ϵ .

Dado que la oscilación en los niveles de los productos proteicos de los genes reloj parece ser fundamental para el funcionamiento del oscilador es lógico pensar que la degradación de éstas proteínas sea un proceso importante que impida la actividad constante de las mismas. En *Drosophila*, la degradación de PER y TIMELESS (TIM), otra proteína reloj en la mosca, por la vía de protosomas de ubiquitina parece ser un proceso importante para el funcionamiento del reloj, ya que mutaciones en componentes de esta vía producen altos niveles constitutivos de PER y TIM fosforilados y moscas con comportamiento circadiano arrítmico. Otras vías de activación, inactivación y degradación de proteínas reloj surgirán seguramente como importantes reguladores de los componentes del reloj y representan un área de la que poco se conoce en el campo de los relojes moleculares.

4.3. Vías de entrada y salida al reloj molecular

4.3.1. Sincronización del reloj molecular por la luz

Los ritmos circadianos, y los osciladores de los que dependen, poseen períodos diferentes de 24 horas. Aún en casos en que el período difiera de 24 h en sólo unos minutos, un reloj circadiano sería inútil si no fuera susceptible de ser sincronizado por alguna variable ambiental que oscile con el día solar. La gran precisión del ciclo de luz oscuridad ambiental ha favorecido la selección de la luz como el estímulo sincronizador más importante en la mayoría de los sistemas circadianos conocidos. De nuestra analogía con el reloj despertador, se desprende que debe existir alguna perilla mediante la cual la luz pueda ajustar al reloj a la hora local. ¿Cuáles son las perillas moleculares que transmiten información fótica al reloj?

En primer lugar, el mecanismo de sincronización dependerá en gran parte de si las células del reloj sean o no intrínsecamente fotorreceptivas. Tanto en invertebrados como en vertebrados no mamíferos existen ejemplos de osciladores cuyas células son ellas mismas fotorreceptivas. Tal es el caso de las neuronas laterales de *Drosophila* o de las células de la pineal de peces, anfibios, reptiles y aves. En estos casos, la forma más sencilla de sincronizar sería establecer una interacción directa entre una molécula fotorreceptora y el ciclo molecular del oscilador. La fotorrecepción podría inducir la degradación, la síntesis o cambio en actividad de una de las variables de estado del oscilador en forma aguda, y esto implicaría un cambio en la fase del reloj. De hecho, este parece ser el mecanismo por el que el oscilador de *Drosophila* es sincronizado. El criptocromo (CRY) de las moscas tiene una función fotorreceptiva similar a la de sus parientes en plantas. CRY se asocia con TIM en forma dependiente de la luz. Esta asociación lleva a la degradación de TIM, y eventualmente a la degradación de PER, procesos necesarios para el cambio de fase del oscilador molecular.

En mamíferos, las únicas células fotorreceptivas capaces de transmitir información fótica al cerebro se encuentran en el ojo y las células osciladoras del NSQ deben ser sincronizadas por vías aferentes de la retina. Células ganglionares de la retina proyectan al NSQ directamente vía el haz retinohipotalámico, e indirectamente vía otras regiones que a su vez proyectan al NSQ. Recientemente se ha demostrado que la gran mayoría de las células ganglionares que proyectan al NSQ contienen melanopsina. Las células ganglionares que contienen melanopsina son intrínsecamente fotorreceptivas y capaces de transmitir información fótica al NSQ. El descubrimiento y caracterización de dichas células ha cambiado radicalmente nuestra "visión" de la retina al demostrar que la fotorrecepción no es una propiedad restringida a conos y bastones, y ha permitido explicar cómo es posible que animales que carecen de los mismos puedan sincronizar sus ritmos circadianos al ciclo de luz-oscuridad. Si bien las células ganglionares retinianas que contienen melanopsina parecen ser suficientes para la sincronización de los ritmos, la transducción lumínica por conos y bastones también puede ser transmitida al NSQ.

El principal neurotransmisor responsable de la sincronización fótica del NSQ es glutamato, que es liberado por los terminales del haz retinohipotalámico (ver Capítulo 5). La liberación de glutamato en el NSQ durante la noche subjetiva, pero no durante el día subjetivo, activa una vía de transducción de señales que lleva a la fosforilación del factor de transcripción CREB, el cual puede activar la transcripción mediante el reconocimiento de una secuencia específica llamada elemento de respuesta al cAMP (CRE) que se encuentra en los promotores de genes específicos. La fosforilación de CREB es consistente con el incremento en ARNm de *Per1* inducido por la luz durante la noche subjetiva, ya que el promotor de este gen posee un elemento CRE. El gen *Per2* también posee elementos de respuesta similares al CRE y el nivel de su ARNm también aumenta en respuesta a un pulso de luz durante la noche

subjetiva, si bien el patrón temporal de respuesta es diferente al de *Per1*. Un incremento en los niveles de ARNm de *Per1* o *Per2* durante el inicio de la noche implicaría un retraso en la fase del reloj, ya que se extenderían los valores de expresión diurnos al inicio de la noche. Por otro lado, un incremento de los mismos ARNm durante el final de la noche implicaría un avance de fase, ya que se anticiparían los valores de expresión diurnos al final de la noche. De este modo, el efecto de la luz en la expresión de estos genes reloj durante el inicio y el final de la noche subjetiva es coherente con el desplazamiento de fase que la luz produce en el ritmo circadiano de actividad locomotora (ver [Capítulo 4](#)). No obstante, el proceso de sincronización del reloj molecular por la luz es aparentemente más complejo que un simple incremento en la expresión de uno o dos genes reloj y varios resultados han indicado que tanto diferentes vías de transducción de señales como diferentes genes reloj pueden estar involucrados respectivamente en avances o retrasos de fase ocasionados por la luz.

4.3.2. Vías de salida del reloj molecular

La oscilación del reloj molecular en cualquier organismo serviría de poco si dicho reloj no pudiera comunicar su información temporal al resto de los procesos celulares que deben ser organizados temporalmente. El NSQ utiliza señales químicas y eléctricas mediante las cuales gobierna procesos fisiológicos y comportamentales. De alguna forma la oscilación en la expresión de los genes reloj debe asociarse con genes cuya expresión debe oscilar en forma circadiana. Hasta el momento poco se conoce de los mecanismos por los cuales esto ocurre pero existen algunas vías de salida moleculares caracterizadas. Las proteínas reloj no sólo tienen la capacidad de controlar la expresión de genes reloj, sino también de genes que no son parte del reloj molecular pero cuya expresión depende del mismo. A estos genes se los conoce como *genes controlados por el reloj* (GCRs) (Figura 5.A). Un GCR bien caracterizado en mamíferos es el de la vasopresina, un neuropéptido presente en células del NSQ que constituye una señal química de salida del núcleo. El gen de la vasopresina contiene una caja E, mediante la cual el dímero CLOCK-BMAL1 tiene la capacidad de inducir la transcripción del mismo. La transcripción de vasopresina, además, se encuentra negativamente regulada por los elementos negativos del reloj.

Mecanismos similares al del gen de la vasopresina se han descrito para otros GCRs y en principio es razonable pensar que cualquier gen con una caja E en su promotor sea susceptible de regulación rítmica. No obstante, probablemente éste no sea el único mecanismo mediante el cual proteínas reloj modifiquen la expresión de GCRs, en particular si tenemos en cuenta que existen cientos de genes cuya expresión es regulada de forma circadiana. Finalmente, aún se desconoce cómo el reloj molecular modifica procesos celulares fundamentales para la expresión de los ritmos, tales como la actividad eléctrica de las células del NSQ, o vías bioquímicas específicas. Si bien todos estos procesos podrían ser modificados mediante la regulación circadiana de la transcripción de genes específicos, es concebible que las proteínas reloj también tengan la capacidad de modificar la actividad de otras proteínas mediante la asociación con las mismas o mediante modificaciones posttraduccionales.

4.3.3. La orquestación de relojes independientes

El dramático progreso en el conocimiento de las bases moleculares de la ritmicidad circadiana en mamíferos contrasta con lo poco se conoce acerca de los procesos sincronización entre los osciladores unicelulares independientes del NSQ. Si bien el NSQ está constituido por miles de relojes unicelulares capaces de oscilar con períodos independientes, el núcleo se comporta como un tejido oscilador con una señal de salida coherente. ¿Cuáles

son los mecanismos que permiten a las células reloj oscilar en sincronía? ¿Cómo es posible, además, que un grupo relativamente pequeño de células (aproximadamente 10,000 neuronas en cada uno de los dos NSQs bilaterales) gobierne la temporización de procesos biológicos tan diversos como la secreción de hormonas, el ciclo de sueño-vigilia y la regulación de la temperatura corporal? En particular, si tenemos en cuenta que estos procesos oscilan con diferentes fases durante el día.

Si bien los mecanismos de sincronización entre las células del NSQ aún no se conocen por completo, es claro que las células reloj pueden ser agrupadas en subpoblaciones de osciladores, y que esta agrupación tiene efectos dramáticos en la ritmicidad circadiana del organismo. Esto es puesto en evidencia en al menos dos modelos experimentales. En el hámster con partición (*splitting*), el ritmo de actividad locomotora tiene un período de aproximadamente 12 h, en lugar de aproximadamente 24 h, y este período está asociado con la oscilación en antifase de los NSQ de la izquierda y de la derecha. En el caso de la rata, cuyos ritmos son desincronizados bajo ciclos de luz-oscuridad artificialmente cortos (22 h), dos oscilaciones de diferente período en el mismo animal son aparentemente el resultado de la desincronización entre el NSQ ventrolateral y NSQ dorsomedial.

Entre los mecanismos de sincronización entre células de NSQ se han propuesto la comunicación a través de *gap junctions* (uniones hendidas), la transmisión gabaérgica, y la liberación del péptido intestinal vasoactivo (VIP). La disponibilidad de técnicas de adquisición de imágenes sofisticadas, con la ingeniería de animales transgénicos cuya expresión de genes reloj se asocia a la de genes cuyos productos pueden ser visualizados fácilmente, como la luciferasa proveniente de las luciérnagas o la proteína fluorescente verde de las medusas, permite el análisis de expresión de genes reloj en neuronas individuales de explantes de tejido del NSQ. Mediante estas técnicas se ha demostrado que si bien las neuronas del NSQ tienen la capacidad de oscilar autónomamente, la incomunicación intercelular mediante el bloqueo de potenciales de acción o de la transmisión VIPérgica parece afectar la capacidad de algunas neuronas de oscilar. De este modo, las propiedades de tejido del NSQ parecen ser importantes no sólo para la sincronización entre células y la comunicación con el resto del cerebro, sino también para mantener las propiedades oscilatorias de sus células.

5. Bases moleculares de la ritmicidad circadiana en humanos

Los procesos moleculares que constituyen el reloj molecular de mamíferos no han sido descritos por completo en el ser humano, debido a las limitaciones obvias en el estudio de expresión. No obstante, los homólogos de todos los genes reloj mencionados han sido identificados y en la mayoría de los casos clonados. Algunos de ellos han sido también estudiados *in vitro*, y los mismos parecen operar mediante mecanismos similares e incluso pueden interactuar con genes y proteínas reloj de otras especies de mamíferos. El estudio del reloj molecular del ser humano seguramente avanzará enormemente a partir de la demostración de que muchos tejidos periféricos, tales como fibroblastos dérmicos o células hepáticas se comportan como osciladores circadianos periféricos con una maquinaria molecular sumamente similar a la del NSQ (ver [Capítulo 6](#)). De este modo, es posible generar cultivos primarios a partir de biopsias extraídas de piel u otras fuentes y estudiar la expresión de genes reloj en distintos tipos celulares.

El conocimiento de los componentes moleculares del reloj de mamíferos ha permitido caracterizar las bases genéticas de diferencias en el fenotipo circadiano entre distintos grupos de seres humanos, así como de las bases genéticas de síndromes que involucran al sistema circadiano.

5.1. Alondras y búhos

Existen diferencias individuales en las horas del día preferidas para la actividad y el reposo. Los sujetos caracterizados como “alondras matutinas” típicamente prefieren destinar las horas de actividad a las horas tempranas de la mañana, y el comienzo del sueño a horas tempranas de la noche. Por otra parte, en los sujetos caracterizados como “búhos nocturnos” la actividad tiene lugar preferentemente durante la noche temprana y el comienzo del sueño es usualmente tarde durante la noche. Esta diferencia entre las fases de los dos tipos de sujetos está aparentemente causada por diferencias entre los sistemas circadianos de los individuos y no por factores ambientales. Recientemente se ha demostrado que existe un polimorfismo en un nucleótido simple en el gen *Clock* que puede explicar la diferencia entre madrugadores y trasnochadores. El polimorfismo consiste en una sustitución de una T por una C en la posición 3111 del cDNA de *Clock*. Individuos heterocigotos para el alelo 3111C, pero no los homocigotos, se autoidentifican como más nocturnos que aquellos homocigotos para 3111T. Si bien los resultados para los homocigotos 3111C no apoyan a la hipótesis, él mismo es probablemente un artefacto del bajo número de individuos analizados para este fenotipo.

5.2. Síndrome de fase avanzada de sueño

El síndrome de fase avanzada de sueño (SFAS, o *Advanced sleep phase syndrome*, ASPS) fue descrito inicialmente en ancianos y es menos frecuente en gente joven. Pacientes con SFAS presentan sensación de sueño durante las últimas horas de la tarde, van a dormir espontáneamente a horas tempranas de la noche (18:00 a 21:00 h) y despiertan a tempranas horas de la mañana (01:00 a 04:00 h). Los registros electroencefalográficos de sueño son normales cuando los pacientes duermen durante sus horas preferidas. Sin embargo, cuando se les impone un inicio de sueño tardío, los pacientes aún madrugan y se produce un acortamiento del episodio de sueño y sensación de sueño durante las últimas horas de la tarde. El SFAS en pacientes jóvenes está aparentemente determinado genéticamente y se han descrito al menos 4 familias en las que el síndrome es transmitido hereditariamente. En una de estas familias se descubrió que el SFAS está asociado con una mutación puntual en el gen *Per2* que reemplaza a una serina por una glicina en la proteína PER2 en uno de los sitios en los que PER2 es fosforilada por CKI ϵ (Figura 5.A). La disminución de la fosforilación de PER2 aparentemente produce una acumulación más rápida de PER2, y esto acorta el ciclo molecular. De este modo, estos pacientes de SFAS son fenotípicamente similares a los hámsters portadores de la mutación *tau*, si bien en el caso del hámster la mutación se encuentra en el gen de la CKI ϵ . El diagnóstico genético en este caso de SFAS se remonta, entonces, al descubrimiento inicial del gen *per* en *Drosophila* y representa un ejemplo impecable de cómo el estudio de las bases genéticas del comportamiento en modelos experimentales puede desembocar en la diagnosis, y probablemente tratamiento, de enfermedades.

5.3. Síndrome de fase retrasada de sueño

El síndrome de fase retrasada de sueño (SFRS, o *Delayed sleep phase syndrome*, DSPS) es una de las patologías de sueño más comunes. Se caracteriza por una incapacidad para dormirse por la noche y para despertarse por la mañana, lo que resulta, en general, en un retraso de fase en el episodio de sueño diario. Los pacientes con SFRS suelen iniciar su sueño entre las 03:00 y las 06:00 h y despertar entre las 10:00 y las 15:00 h; y presentan registros electroencefalográficos normales de sueño si se les permite dormir durante sus horas preferidas. Un estudio reciente comparó a 48 pacientes con SFRS con 100 pacientes normales y detectó un incremento en la frecuencia de un alelo polimórfico del gen *Per3* en los pacientes con SFRS. Si bien esta asociación es significativa, se

desconoce el mecanismo por el cual este cambio en la secuencia de *Per3* puede determinar el retraso en la fase del reloj circadiano que es aparente en los pacientes con SFRS.

El descubrimiento de nuevos genes involucrados en el reloj molecular y de nuevos genes cuya expresión es controlada por el reloj permitirá caracterizar no sólo las bases genéticas de síndromes que afectan al sistema circadiano sino también establecer alternativas de tratamiento frente a desafíos temporales, tales como el *jet lag* o los turnos nocturnos de trabajo, a los que gran parte de la población humana se expone.

Relato de un descubrimiento, por William Schwartz.

Estábamos a principios de 1974. Patty Hearst acababa de ser secuestrada, el escándalo Watergate estaba a punto de destaparse, y yo estaba acabando mi último año de Medicina en la Universidad de California, en San Francisco (UCSF), cuando recibí la noticia de que podía empezar una beca postdoctoral al año siguiente en el Laboratorio de Neurofisiología del *National Institutes of Health (NIH)*, en Bethesda, Maryland. Estaba muy excitado, sabía que quería probar suerte en la investigación básica, pero también estaba asustado por que era consciente de que no sabía lo suficiente de neuroanatomía, neuroquímica o neurofisiología. Así cada noche durante mi residencia médica (de Julio de 1974 a Junio de 1975, también en el UCSF), me leía [The Neurosciences](#), tres volúmenes, de cerca de 3000 páginas del “programa de estudios” del Programa de Investigación en Neurociencias (más tarde, en 1979, apareció un cuarto volumen). El volumen 3 incluía una sección con 10 capítulos titulada “Oscilaciones circadianas y organización en los sistemas nerviosos.” El capítulo final de esta sección era de Robert Y. Moore, que apuntaba que las lesiones en una estructura recientemente descrita, el núcleo supraquiasmático (NSQ), eliminaban los ritmos endocrinos diarios.

Cuando llegué al NIH en Julio de 1975, me encargaron de los registros electrofisiológicos de la sustancia negra en monos. Conocí a Frank Sharp, otro postdoc que estaba trabajando con el método de Louis Sokoloff de la 2-deoxiglucosa (2DG), una nueva técnica con marcadores para medir la actividad metabólica (utilización de glucosa) utilizando autoradiografías de secciones de cerebro. El problema era que las secciones estaban hechas polvo, muy deformadas, especialmente cerca del hipotálamo – se supone que debido a que los cerebros se congelaron demasiado rápido en nitrógeno líquido. Acometimos la búsqueda de un método menos agresivo y finalmente nos decidimos por la inmersión en 2-metilbutano (isopentano) enfriado a -30°C .

Estaba asistiendo a una serie muy agradable de conciertos clásicos del *Budapest String Quartet* en la biblioteca del Congreso en Washington D.C. Harold (Hal) Gainer, un jefe de sección del NIH, y un experto en neuropéptidos, también estaba allí, y estuvimos hablando en los descansos. Se le ocurrió un experimento con 2DG y su efecto sobre la activación de las neuronas magnocelulares productoras de vasopresina, y le dije que yo podría preparar buenas secciones hipotalámicas con nuestro nuevo método de congelación.

Probé el experimento de Hal (al principio creímos que era un resultado negativo). Pero al cortar las secciones seriadas del hipotálamo, vi autoradiografías con dos puntos con más señal situados sobre el quiasma óptico. Nos dimos cuenta que habíamos encontrado un marcador funcional para el NSQ. Nos llevó dos semanas hacer los experimentos de la hora del día y la iluminación y el artículo estaba aceptado¹, los revisores sólo nos pidieron que añadiéramos una barra de escala a la ilustración y que utilizáramos un test estadístico distinto. Hal seguía pensando en su experimento, que finalmente resolvimos, proporcionando con el tiempo un punto de vista crítico al método de la 2DG².

Todavía estoy intentando aprender cómo hacer descubrimientos.³ Entretanto, un consejo: tómate la noche libre y vete a un concierto.

1. Schwartz WJ, Gainer H. Suprachiasmatic nucleus: use of ^{14}C -labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science* 197:1089-1091, 1977.

2. Schwartz WJ, Smith CB, Davidsen L, Savaki H, Sokoloff L, Mata M, Fink DJ, Gainer H. Metabolic mapping of functional activity in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Science* 205:723-725, 1979.

3. Paydarfar D, Schwartz WJ. An algorithm for discovery. *Science* 292:13, 2001.

6. Lecturas adicionales

6.1. Libros

- Borges JL (1951) El idioma analítico de John Wilkings. En: Otras Discusiones.
- Dunlap JC (2004) Molecular biology of circadian pacemaker systems. In: Chronobiology: Biological Timekeeping (Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ, eds), pp 213-253. Sunderland: Sinauer.
- Johnson CH, Kondo T (2001) Circadian Rhythms in Unicellular Organisms. In: Handbook of Behavioral Neurobiology: Circadian Clocks (Takahashi JS, Turek FW, Moore RY, eds), pp 61-77. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Ralph MR, Vitaterna M (2001) Mammalian clock genetics. In: Handbook of Behavioral Neuroscience: Circadian Clocks (Takahashi JS, Turek FW, Moore KE, eds), pp 433-447. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

6.2. Artículos

- Albrecht U, Sun ZS, Eichele G, Lee CC (1997) A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell* 91:1055-1064.
- Cermakian N, Boivin DB (2003) A molecular perspective of human circadian rhythm disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 42:204-220.
- Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280:1564-1569.
- Hardin PE (2004) Transcription regulation within the circadian clock: the E-box and beyond. *J Biol Rhythms* 19:348-360.
- Harms E, Kivimae S, Young MW, Saez L (2004) Posttranscriptional and posttranslational regulation of clock genes. *J Biol Rhythms* 19:361-373.
- King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW, Takahashi JS (1997) Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89:641-653.
- Konopka RJ, Benzer S (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:2112-2116.
- Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98:193-205.

- Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, Menaker M, Takahashi JS (2000) Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 288:483-492.
- Michel S, Geusz ME, Zaritsky JJ, Block GD (1993) Circadian rhythm in membrane conductance expressed in isolated neurons. *Science* 259:239-241.
- Ralph MR, Menaker M (1988) A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241:1225-1227.
- Reppert SM, Weaver DR (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 63:647-676.
- Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF, Jr., Reppert SM (1997) Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19:1261-1269.
- Stanewsky R (2002) Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell Tissue Res* 309:11-26.
- Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G, Lee CC (1997) RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 90:1003-1011.
- Takahashi JS (2004) Finding new clock components: past and future. *J Biol Rhythms* 19:339-347.
- Takahashi JS, Pinto LH, Vitaterna MH (1994) Forward and reverse genetic approaches to behavior in the mouse. *Science* 264:1724-1733.
- Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y (1997) Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 389:512-516.
- van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A (1999) Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398:627-630.
- Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW, Takahashi JS (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264:719-725.
- Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14:697-706.
- Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H (2003) Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 302:1408-1412.

8. Resumen

Prácticamente todos los seres vivos muestran oscilaciones biológicas con períodos cercanos a 24 h y sincronizadas al día solar. Dichas oscilaciones, conocidas como ritmos circadianos, son el resultado de la interacción entre tres componentes básicos presentes en todo sistema circadiano: 1) vías de entrada que sincronizan al reloj circadiano; 2) uno o más relojes o marcapasos circadianos; y 3) vías de salida responsables de la expresión de los ritmos circadianos. En los últimos años el conocimiento de los genes y mecanismos moleculares que constituyen dichas componentes ha crecido dramáticamente. En este capítulo se discuten las componentes moleculares básicas de un sistema circadiano y, más específicamente, la maquinaria molecular circadiana de mamíferos.