

Organización del sistema circadiano en vertebrados

Diego A. Golombek y Paola C. Yannielli

Laboratorio de Cronobiología, Universidad Nacional de Quilmas. Buenos Aires, Argentina.

Presentación

En este capítulo se trazará una breve reseña sobre el sistema circadiano en los vertebrados y, particularmente, en los mamíferos. La introducción se referirá a las características generales de los sistemas circadianos y la historia de su investigación. En el desarrollo, una vez definido qué es un sistema circadiano, se elaborará una síntesis acerca de los modelos estudiados en vertebrados no mamíferos (anfibios, reptiles y aves). A continuación se detallarán las bases fisiológicas de los ritmos circadianos en mamíferos, incluyendo la estructura y función de los núcleos supraquiasmáticos, sus características neuroquímicas y celulares, sus mecanismos de sincronización y eferencias. Para ejemplificar estas funciones se explicarán las diversas técnicas utilizadas para su estudio (electrofisiología, neuroanatomía, comportamiento, transplantes, biología molecular). Se pondrá énfasis en la fisiología de neuronas individuales de los NSQ y la necesidad de redes neuronales que acoplen su funcionamiento, así como en la utilidad de quimeras para el estudio de esta comunicación intercelular. Asimismo, se explicarán las vías de transducción de señales de los NSQ que permiten su sincronización y acoplamiento, así como modelos comportamentales útiles para comprender su funcionamiento (splitting, sincronización fótica y no fótica, etc.). Por último, se indicará la importancia del estudio de organismos mutantes (como el hamster *tau* o el ratón *clock*) para comprender el funcionamiento del sistema circadiano. Finalmente se brindarán algunas consideraciones acerca de la importancia de contar con un sistema circadiano eficaz y predecible, a partir de las evidencias de campo y de laboratorio y de las inferencias evolutivas de su estudio.

CRONOBIOLOGÍA EN LA CALLE. Un poco de tiempo y de latín en el cerebro

“El tiempo entra por los ojos. Eso lo sabe cualquiera”, escribió Julio Cortázar hace más de 50 años. Si los cronobiólogos le hubieran hecho caso a tiempo, se hubieran ahorrado muchas décadas de experimentos en busca del reloj biológico de los mamíferos. ¿Dónde se esconde el *circa diem* en el cerebro?

Se cuenta que la hermosa Clythie solía seguir el camino del dios sol (Febo o Apolo, dependiendo de vuestra mitología favorita) por el cielo, rogándole que se detuviera y la llevara. El dios no le hizo caso, y ella se quedó clavada en la Tierra, su cuerpo fue sufriendo una metamorfosis y quedó condenada a seguir el camino del sol desde el suelo, transformada en... un heliotropo (o girasol). He aquí un perfecto ritmo diario: un organismo que día a día repite un comportamiento (sólo que en este caso este cambio está generado por un factor ambiental). Lo interesante es que el organismo pueda independizarse del ambiente y generar sus propios tiempos internos.

El sistema circadiano (del latín, "cerca de un día") es aquél que nos permite estar de acuerdo con un planeta que gira y aprovecharlo en forma íntegra. Sin este sistema, las tareas cotidianas de comer (o ser comido) o de buscar pareja, así como toda la fisiología del organismo, se verían seriamente dificultadas, al no poder orquestar adecuadamente las funciones corporales entre sí y con el medio ambiente.

Este sistema se basa en la actividad de verdaderos relojes biológicos que miden el tiempo y son puestos en hora por el mundo en el que habitan sus portadores. En general se acepta la presencia de un reloj principal (cuyo mejor ejemplo son los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo de mamíferos) que, por un lado, se sincroniza con los ciclos de la naturaleza y, por otro, controla los ritmos fisiológicos y comportamentales del organismo. Sin embargo, recientemente se ha reportado la existencia de osciladores periféricos o secundarios en diversos tejidos, que parecen compartir el mecanismo molecular que sustenta los ciclos circadianos.

Para conocer el sistema circadiano se han realizado experimentos de *in vivo* tipo, desde descripciones neuroanatómicas y neuroquímicas hasta trabajos de campo, pasando por cirugías experimentales, trasplantes y biología molecular. Todas estas herramientas indican la presencia de un robusto mecanismo medidor del tiempo que le confiere una singular ventaja adaptativa a su usuario: guardar el tiempo en el cerebro y, sobre todo, poder predecir los cambios de la naturaleza requieren de un preciso relojero en cada una de las células.



FIGURA 1: Se cuenta que la hermosa Clythie solía seguir el camino del dios sol (Febo o Apolo, dependiendo de vuestra mitología favorita) por el cielo, rogándole que se detuviera y la llevara. Finalmente, cansada del despecho y obligada a seguir el recorrido diario del sol, la joven se convirtió en un heliotropo (o girasol). (Tomado de *Metamorfosis*, de Ovidio).

CONTENIDOS DE ESTE CAPÍTULO

¿Qué es un sistema circadiano?

Organización funcional del sistema circadiano en vertebrados

Peces, reptiles y anfibios

Aves

El sistema circadiano de los mamíferos: estructura general

En busca del reloj circadiano: los núcleos supraquiasmáticos

El marcapasos o reloj central: localización y neuroanatomía

Evidencias de que los NSQ constituyen un reloj central en mamíferos

Neuroquímica del reloj circadiano

Vías de entrada al reloj

Vías de salida del reloj

Un ejemplo de transmisión neural de la señal rítmica del reloj: Regulación de la secreción de la melatonina pineal.

Neuroquímica del reloj

Un reloj de bolsillo: los NSQ in vitro y los osciladores celulares

La puerta de entrada: vías de sincronización de los NSQ

Modelos de sincronización en mamíferos

Vías de transducción de señales

La vía de escape: acoplamiento y eferencias del reloj

Evidencias neurales y humorales

Modelo de partición (splitting)

Mutantes y quimeras para entender al reloj

El hamster tau

El ratón clock

Otros mutantes en mamíferos

Quimeras circadianas

Las ventajas de un sistema circadiano

Lecturas adicionales

Cuestiones de revisión

Historia de un descubrimiento

El descubrimiento del hámster *tau*

Ritmos circadianos en la Antártida: un modelo para comprender la necesidad de contar con un sistema circadiano aun cuando el mundo no sea un dador de hora infalible

1. ¿Qué es un sistema circadiano?

De entre los diversos “circarritmos” que presentan los organismos, los ritmos circadianos se destacan como los que responden a la alternancia ambiental más obvia; la de los días y las noche de nuestro planeta. En un mundo que gira, conviene estar a la altura – o, mejor dicho, al tiempo – de los ciclos imperantes y ser capaces de predecirlos y ajustarse a ellos. Así se han seleccionado sistemas que no sólo responden al ambiente sino que también generan sus propios ritmos orgánicos aun en ausencia de señales externas.

La presencia de relojes en el cuerpo no resulta completamente obvia. Es perfectamente plausible un organismo cuyos patrones temporales dependan exclusivamente de factores externos muy regulares, como la gran variedad de fenómenos naturales periódicos: éste sería un organismo cuyos ritmos biológicos son exógenos. En este caso, en ausencia de variaciones externas desaparecerían los ritmos en cuestión. Como se vio en el capítulo XXX, aquellos ritmos que se mantienen en condiciones ambientales constantes son llamados endógenos, y dependen de relojes internos cuya acción es independiente del ambiente, si bien se regulan y ponen de acuerdo con el mundo. Es interesante destacar que esta dicotomía “endógeno-exógeno” es una de las discusiones históricas de la cronobiología: ya en el primer congreso internacional realizado en 1960 en Cold Spring Harbor se presentaron pruebas a favor de una u otra hipótesis; finalmente, la demostración de la existencia de estructuras de relojería internas en la gran mayoría de los organismos vivos inclinó la balanza en favor de la hipótesis endógena de los ritmos biológicos.

En ausencia de sincronizadores los ritmos biológicos expresan su componente endógeno, que responde al período específico del reloj, que es una característica de la especie (si bien existen variaciones interindividuales). Este período endógeno es el que debiera llamarse, estrictamente, circadiano y corresponde a aproximadamente 24 horas (de ahí su nombre de “cerca de un día”). Para los ritmos sincronizados a 24 horas por el ambiente se reserva la expresión de “ritmo diario” o “nictemeral”. Resulta evidente que, por más cercano a 24 horas que sea el período endógeno de un reloj biológico, si no se sincroniza con el mundo que lo rodea, al cabo de unos pocos ciclos será completamente inútil. Imaginemos un reloj endógeno con un período de 24.1 horas (o, lo que es lo mismo, 24 horas y 6 minutos – un reloj que adelanta 6 minutos por día). Al cabo de diez días, el portador de este muy preciso reloj verá sus ritmos desfasados una hora con respecto al ambiente; a medida que pasan los días se irá desfasando más y más, sin que pueda aprovechar las ventajas de controlar el tiempo de su biología.

Un reloj biológico es, entonces, un sistema temporizador autosustentado y con capacidad de ajustar su hora con determinadas señales del ambiente. No es un reloj de sol, porque puede decirnos la hora en ausencia de señales ambientales, ni un reloj de arena, porque puede dar la hora aun tiempo después de que estas señales ambientales lo impulsen. La capacidad de sincronizarse es fácilmente reconocida por aquellos que realizaron vuelos transmeridianos: unos días mas tarde del arribo a destino, el reloj biológico se ajusta a la hora local.

Otras propiedades de los relojes biológicos son la independencia, dentro de ciertos límites, de la temperatura, así como los efectos *a posteriori* (*post-effects*), que relacionan el período en condiciones constantes con la intensidad luminica y fotoperíodos previos. La regla de Aschoff deviene de esta última propiedad de los relojes: los animales de hábitos nocturnos poseen períodos menores a 24 horas y los de hábitos diurnos períodos mayores, salvo excepciones (por ejemplo, la rata, un animal nocturno con período entre 24 y 25 horas). Un aumento en la intensidad de la luz a la que se expone a animales nocturnos produce un aumento posterior en su período en condiciones constantes. En animales diurnos el aumento de la intensidad de la luz produce el efecto contrario.

No cabe duda de que la alternancia luz-oscuridad es el principal de los ciclos ambientales con periodicidad diaria (a menos, claro que uno resulte ser un organismo ciego o que viva en ambientes donde no llegue la luz). De esta manera, uno de los principales componentes del sistema circadiano será su conexión anátomo-fisiológica con la percepción de la luz.

En los vertebrados existe fotorrecepción circadiana a nivel de los ojos y también extra-retiniana. En anfibios, reptiles y aves la glándula pineal también posee funciones fotorreceptoras (en forma conjunta con los ojos). Asimismo, en diversos grupos existen evidencias de fotorreceptores profundos en el cerebro.

En rigor, podemos considerar que un sistema circadiano consta de tres componentes principales (Fig. 2):

- Un sincronizador ambiental (*zeitgeber*)
- Un componente endógeno de generación de la ritmicidad (reloj biológico)
- Los ritmos circadianos controlados por el reloj

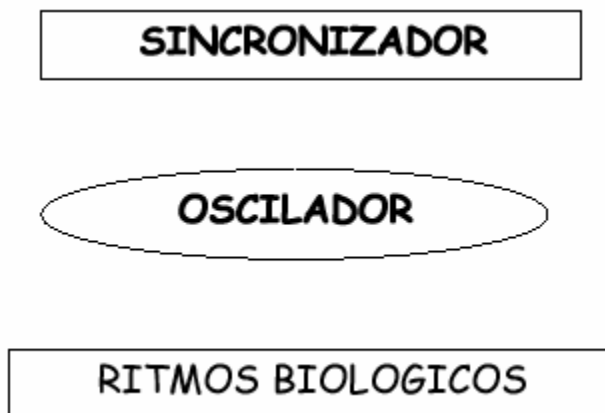


FIGURA 2: Principales componentes del sistema circadiano

Sin embargo, tanto o más importantes que estos componentes son las relaciones entre ellos (lo que lo constituye en un verdadero sistema): el mecanismo de sincronización entre el *zeitgeber* y el reloj (la vía de entrada) y el mecanismo de acoplamiento entre el reloj biológico y los ritmos que controla (Fig. 3). Por supuesto, existen

diversas vías de entrada al reloj, aunque la sincronización principal es de tipo fótica; también existirán diversos mecanismos y vías de salida desde el reloj.

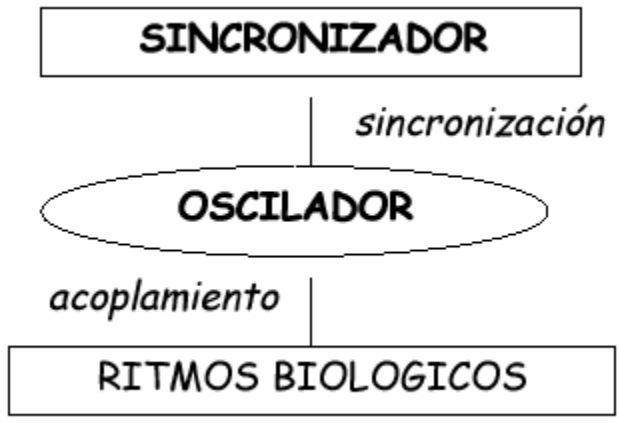


FIGURA 3: Relaciones entre los componentes del sistema circadiano

Finalmente, el modelo se complica por la presencia de relaciones directas entre el zeitgeber y los ritmos (enmascaramiento), sin pasar por el ajuste del reloj, y por los mecanismos de retroalimentación entre los ritmos circadianos y el reloj (Fig. 4).

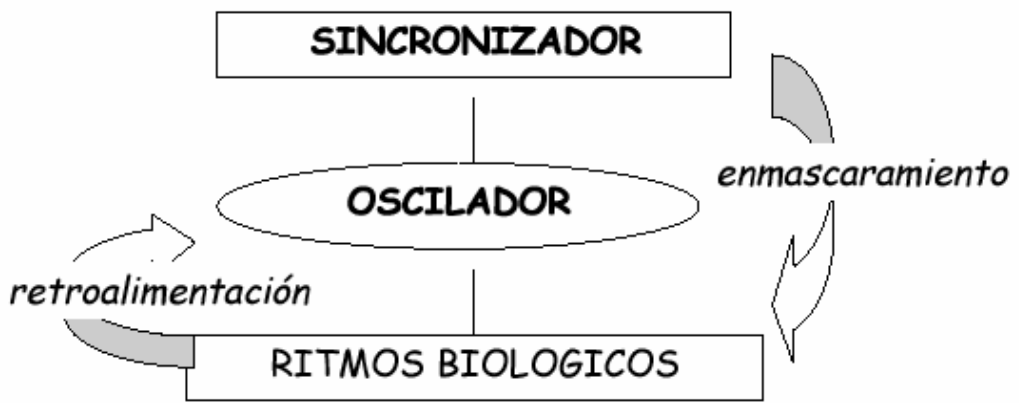


FIGURA 4: Mecanismos de enmascaramiento (del zeitgeber a los ritmos) y de retroalimentación (de los ritmos al reloj).

2. Organización funcional del sistema circadiano en vertebrados

En vertebrados no mamíferos se ha descrito un sistema multioscilar, en general compuesto por los ojos, la glándula pineal y zonas hipotalámicas que serían homólogas a los núcleos supraquiasmáticos. Estas estructuras forman lo que Michael Menaker, uno de los principales cronobiólogos en actividad, llama "el eje circadiano" (y que, bajo ciertas condiciones experimentales, también se comprueba en mamíferos), que se ha mantenido a lo largo de la historia evolutiva de los vertebrados (unos 500 millones de años). Asimismo, estos grupos poseen múltiples entradas fotorreceptoras al sistema, incluyendo la retina, la pineal y, en algunos casos, fotorreceptores profundos encefálicos. Podría decirse que en estos grupos comienza a verse una tendencia a la internalización de las estructuras circadianas (que en muchos invertebrados se encuentran en zonas más periféricas y, por ende, más expuestas a diversos riesgos).

2.1. Peces, reptiles y anfibios

En estos grupos de vertebrados se ha descrito la presencia de múltiples osciladores circadianos. Varios peces presentan claros ritmos de actividad locomotora dependientes del fotoperíodo (FIG. 5.). Los ciclóstomos (peces muy primitivos, como las lampreas) presentan ritmos de actividad locomotora bajo el control de la glándula pineal. Asimismo, la pinealectomía causa arritmicidad en algunos peces teleósteos, los cuales presentan sincronización retiniana y de otras zonas (incluyendo la pineal).

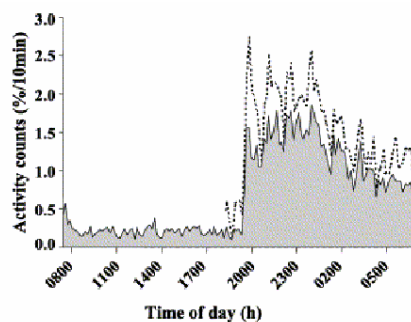


FIGURA 5: Actividad locomotora promedio en el lenguado bajo condiciones de laboratorio. Nótese la mayor proporción de actividad nocturna (modificado de Bayarri et al., 2004).

Recientemente se ha caracterizado al pez cebra (zebrafish, *Danio rerio*) como un excelente modelo del sistema circadiano de vertebrados inferiores (Fig. 6 a). Además de estudios moleculares, se han podido determinar

ritmos de actividad locomotora, de función visual y, particularmente, ritmos de producción de melatonina (Fig. 6b). Se ha estudiado en detalle el desarrollo ontogenético en pineal y retina, a través del estudio de la enzima serotonina N-acetil-transferasa y la presencia de la hormona melatonina en embriones, larvas y adultos. Un resultado reciente arroja luz acerca de los mecanismos de herencia de la ritmicidad circadiana en vertebrados. Existen genes (como *Per3*) que oscilan en los ovocitos del pez cebra, y esta ritmicidad también se observa muy temprano en la embriogénesis.

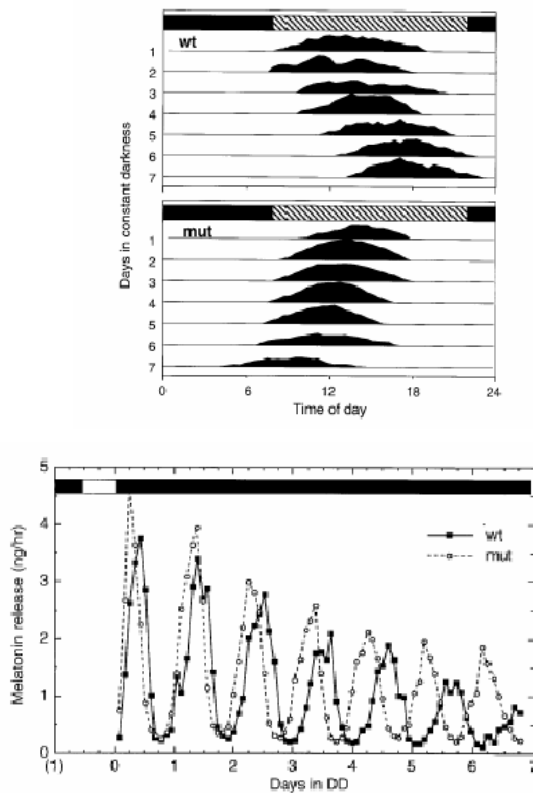


FIGURA 6: a) Actividad locomotora (natación) de larvas de pez cebra en condiciones constantes de laboratorio. Se muestra en el panel inferior la presencia de un mutante circadiano (mut) con un período significativamente menor. b) Ritmo de secreción de melatonina de pineales aisladas de peces cebra adultos, normales y mutantes (modificado de Cahill, G. *Cell Tissue Res* (2002) 309:27-34)

Un excelente modelo para el estudio de ritmos en anfibios lo constituyen los ojos de *Xenopus*, que han sido extensamente estudiados en cuanto a las oscilaciones en la producción de melatonina y otras variables (Fig. 7). El reloj está presente en los fotorreceptores retinianos y se puede sincronizar por luz y tratamientos farmacológicos.

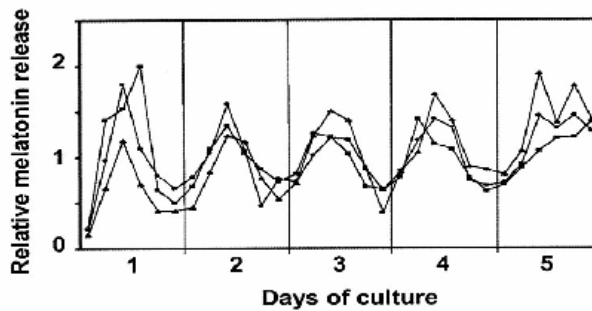


FIGURA 7: Un excelente modelo para el estudio de ritmos en anfibios lo constituyen los ojos de *Xenopus*, que han sido extensamente estudiados en cuanto a las oscilaciones en la producción de melatonina (mostrada en la figura) y otras variables. El reloj está presente en los fotorreceptores retinianos y se puede sincronizar por luz y tratamientos farmacológicos.

Los reptiles *Anolis* e *Iguana* han sido extensamente estudiados en cuanto a la generación y sincronización de ritmos circadianos (Fig. 8). En *Anolis* la pinealectomía produce la abolición completa de los ritmos de actividad locomotora, mientras que *Iguana* posee osciladores no sólo en la pineal sino en el órgano parietal y ojos laterales, que controlan ritmos diferentes.

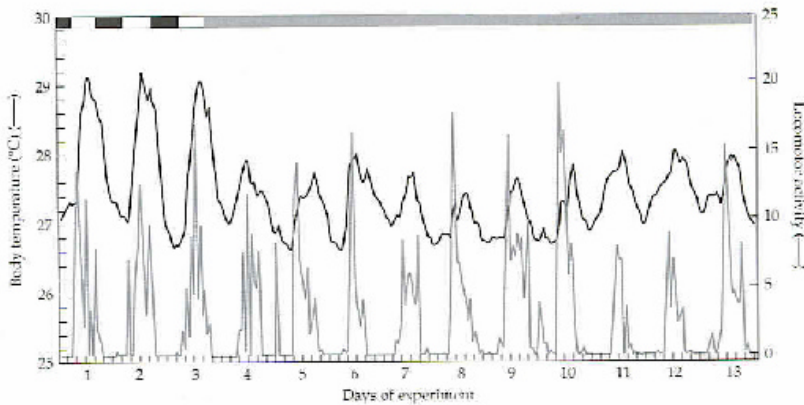


FIGURA 8. Los reptiles presentan ritmos diarios y circadianos. La figura muestra los ritmos de temperatura corporal (negro) y actividad locomotora (gris) de *Iguana* en condiciones de luz-oscuridad y de luz constante (modificado de Tosini y Menaker, J Neurosci 18: 1105-1114, 1998)

2.2. Aves

En las aves existe una jerarquía de osciladores circadianos interactuantes, así como múltiples niveles de fotorrecepción (Fig. 9.a y b). En la década de 1960 se descubrió que la pinealectomía de los gorriones suprime el

ritmo de actividad locomotora; asimismo, la inyección de melatonina lo sincroniza. Otro modelo muy estudiado ha sido la codorniz, en la que los ojos ocupan un papel preponderante en la jerarquía de osciladores: las retinas presentan un ritmo endógeno de secreción de melatonina, y la lesión ocular produce arritmicidad de locomoción y temperatura. Los ojos y las pineales de los pollos también contienen un oscilador circadiano; incluso se ha demostrado que pinealocitos aislados presentan ritmos endógenos. En la paloma existe una sinergia de los relojes retiniano y pineal para el control de los ritmos: sólo la lesión conjunta produce arritmicidad. Finalmente, en otras especies se ha señalado la importancia de los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo en la generación y sincronización fótica de los ritmos, confirmando así la presencia de una compleja red de osciladores que interactúan para generar la ritmicidad circadiana de las aves.

La comunicación entre estos osciladores ha generado el modelo de retroalimentación neuroendocrina, que propone el control recíproco de retina, pineal, e hipotálamo a través de interacciones inhibitorias o resonantes. Por otro lado, recientemente se han clonado algunos de los genes del reloj biológico de aves. Los productos proteicos qCLOCK, qPER2 y qPER3 (la "q" viene de "quail", codorniz) presentan una homología del 79%, 46% y 33%, respectivamente, con sus equivalentes en mamíferos. Estos genes se expresaron en diversos tejidos, y en particular, qPER2 y qPER3 presentaron ritmos circadianos, el primero de los cuales resultó ser sensible a la estimulación con luz.

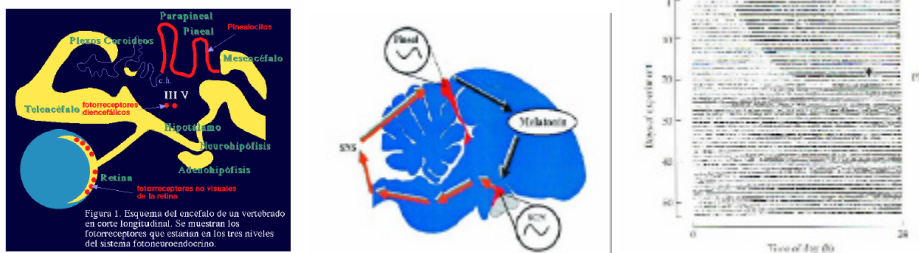


FIGURA 9. a) Las aves presentan diversos niveles de fotorrecepción, a nivel retiniano, en el cerebro profundo (diencefalo) y en la glándula pineal (modificado de Jiménez Lara y García Fernández, XXXX). b) El sistema circadiano de las aves está constituido por osciladores múltiples que interactúan entre sí. En este caso se muestra un circuito de retroalimentación neuroendocrina a través del cual los núcleos supraquiasmáticos y la glándula pineal modulan mutuamente su actividad por vías neurales (vía simpática, SNS) o humoral (melatonina) (modificado de Cassone, Proc Natl Acad Sci U S A. 97(22):11677-9, 2000). c) La pinealectomía (indicada por el día "PX" en la figura) induce la pérdida de los ritmos circadianos en el gorrión (Gaston y Menaker, Science 160:1125-1127, 1968).

3. El sistema circadiano de los mamíferos: estructura general

Más allá de la elegante demostración de la presencia de osciladores circadianos autónomos en diversas áreas (como la retina, el hígado, el bulbo olfatorio o incluso a nivel de cultivos celulares), los mamíferos se caracterizan por la actividad de un reloj primario localizado en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) en la zona ventral del hipotálamo anterior (Fig. 10).

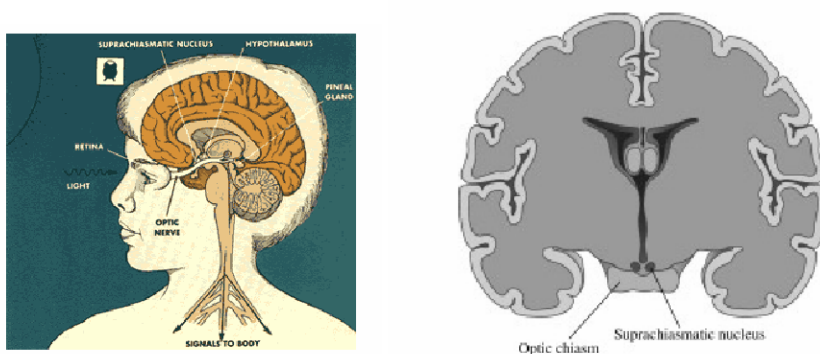


FIGURA 10. a) Localización de los núcleos supraquiasmáticos en el cerebro humano y relación con la vía retinohipotalámica. b) Corte transversal de cerebro humano en el que se aprecia la localización ventral de los NSQ, por encima del quiasma óptico.

La historia del descubrimiento de los NSQ como reloj biológico es fascinante, y revela uno de los pocos ejemplos claros de localización funcional en el cerebro. Tras los experimentos de Curt Richter en la primera mitad del siglo XX, que señalaban al hipotálamo como responsable de ciertos fenómenos periódicos, la búsqueda se afinó gracias a experimentos de trazado neuroanatómico, que finalmente llevaron al descubrimiento de los NSQ como un verdadero reloj biológico, capaz de mantener los ritmos *in vitro* y cuyo trasplante recuperaba la ritmicidad perdida en animales lesionados. El descubrimiento de mutantes con relojes disfuncionales, así como las nuevas herramientas de biología molecular, abrieron una nueva puerta para determinar la estructura del sistema circadiano de mamíferos.

Más allá de las aferencias de diversas zonas cerebrales (como el tálamo o los núcleos del rafe), la principal vía de entrada a los NSQ es a partir del tracto retinohipotalámico (TRH) formado por axones de las células ganglionares de la retina. En cuanto a los fotorreceptores y pigmentos asociados a la percepción circadiana, hace años se realizó la desconcertante observación de que ratones ciegos (de la cepa *rd/rd*, que carecen de bastones) mantienen la sincronización fótica de sus ritmos circadianos (Fig. 11). Recientemente se describió la presencia de un nuevo tipo de fopigmento en la retina de mamíferos, los criptocromos; sin embargo, experimentos con mutantes de estos pigmentos indican que estarían más relacionados con el mecanismo molecular del reloj circadiano que con

la fototransducción. Por último, merece mencionarse el hallazgo de la melanopsina, un nuevo fotopigmento con la particularidad de estar presente no en fotorreceptores clásicos sino en las mismas células ganglionares que forman el TRH, constituyendo un novedoso modelo de fotorrecepción no visual.

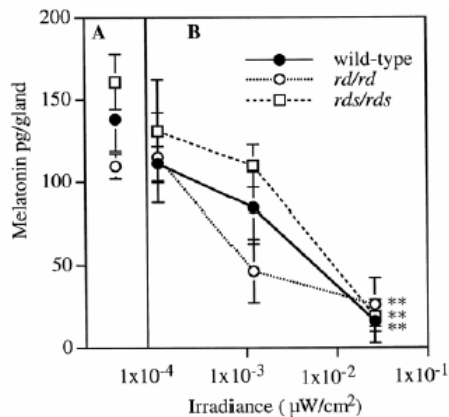


FIGURA 11. a) Como en la canción infantil de los tres ratones ciegos, se pensó que anulando los fotorreceptores que median la visión “clásica” se abolirían los mecanismos de sincronización circadiana. b) Sin embargo, los animales con degeneración de fotorreceptores retinianos clásicos demuestran la presencia de sincronización fótica normal. La figura muestra cómo la luz inhibe la secreción de melatonina pineal en ratones C3H (wild-type) y en mutantes con bloqueo de fototransducción en los bastones (*rd/rd*) o con ablación de los segmentos externos de los fotorreceptores (*rds/rds*) (modificado de Lucas & Foster *Endocrinology* Vol. 140, No. 4, 1520-1524, 1999)

Son menos conocidas las eferencias de los NSQ, a través de estudios de transplante y de marcadores de circuitos neuronales. Uno de los caminos mejor conocidos es el de la vía multisináptica que va de los NSQ a la glándula pineal (Véase cap. XXX). Sin embargo, existen también evidencias a favor de eferencias humorales capaces de controlar ritmos circadianos.

4. En busca del reloj circadiano: los núcleos supraquiasmáticos

La búsqueda del reloj circadiano de los mamíferos ha sido una de las más interesantes aventuras de las neurociencias contemporáneas. Es más, el descubrimiento de este reloj es uno de los mejores ejemplos acerca de la localización precisa de una función (el control de los ritmos circadianos) en el cerebro. Si uno debe enfrentarse a esta búsqueda, es bastante obvio que dirigirá su atención a zonas cerebrales que controlen diversos aspectos del comportamiento y la fisiología del organismo. Así, los experimentos pioneros de Curth Richter en la primera mitad del siglo XX se basaron en lesiones de zonas específicas del cerebro, comprobando que el hipotálamo estaría involucrado en la generación de ritmos. Sin embargo, fue necesario cambiar el enfoque para afinar la búsqueda: ya

que no resulta nada sencillo ir a buscar directamente el reloj, y dado que es conocido el hecho de que la luz lo pone en hora, será cuestión de disfrazarse de luz, seguir la vía neuroanatómica de los estímulos fóticos y estudiar los tejidos blanco de esta vía. Si alguna de estas zonas no posee actividad visual conocida, será un interesante candidato a reloj circadiano. Así, los estudios de Robert Moore determinaron que la vía retinohipotalámica llega hasta los núcleos supraquiasmáticos, y en poco tiempo se los caracterizó como un reloj circadiano con todo derecho.

Como mencionamos, el sistema circadiano de los mamíferos comprende cuatro elementos básicos (Fig. 12), el primero de los cuales nos compete en este capítulo:

- a) un **Marcapasos Central o Reloj**, ubicado en los **Núcleos Supraquiasmáticos del Hipotálamo (NSQ)**. Es en este sitio anatómico donde se generan las señales oscilatorias intrínsecas, con un período cercano a las 24 horas. En experimentos ya clásicos se demostró que la ablación de los NSQ conlleva la pérdida de numerosas funciones fisiológicas y conductuales, y que el trasplante de tejido de los NSQ fetal restituye la temporalidad en el organismo lesionado. Si bien muchísimos ritmos diarios se encuentran directamente bajo el control de los NSQ, también se demostró que algunos ritmos subsistían luego de la lesión. Es decir que existe (y en el caso del hombre resulta particularmente importante) otro (u otros) sitios de generación de ritmos, cuya sincronización no parece depender del ciclo L:O, sino más bien de ciertas rutinas o patrones de alimentación o de actividad social, que en el caso de los seres humanos, ahora sí, podría reducirse a la presencia de un simple reloj de pulsera. De todos modos, con la literatura disponible hasta el momento, puede asegurarse que los NSQ constituyen el reloj central más importante en los mamíferos, y que el ciclo L:O es, asimismo, la señal ambiental más importante en la sincronización de los ritmos biológicos conocidos.
- b) Además, el sistema circadiano está compuesto por **osciladores subsidiarios**, controlados por éste, y **vías de salida desde los NSQ hacia estos sistemas efectores**, necesarios para la expresión de los ritmos;
- c) **vías de entrada para información fótica**, como el tracto retinohipotalámico (RHT), que llevan la información lumínica directamente al reloj y que lo sincronizan al ciclo L:O ambiental; y por último,
- d) **vías de entrada de tipo no fóticas**, que llevan al reloj información "especial" (estado de alerta, aumento de la actividad, factores endocrinos y neurotransmisores) y que también son capaces de sincronizar a los NSQ, y, en condiciones de sincronización normal por luz, constituyen vías modulatorias.

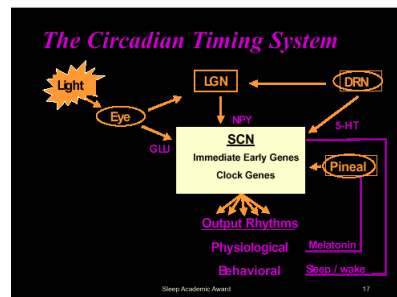
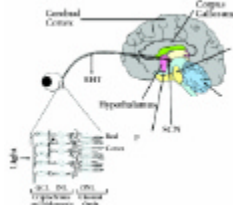
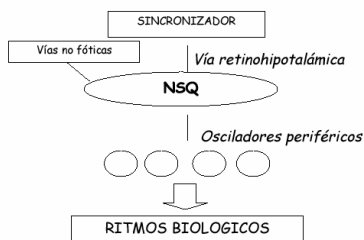


FIGURA 12. A. Los componentes principales del sistema circadiano de los mamíferos pueden resumirse como a) un Marcapasos Central o Reloj, ubicado en los Núcleos Supraquiasmáticos del hipotálamo (NSQ); b) osciladores subsidiarios; c) vías de salida desde los NSQ hacia los sistemas efectores; d) vías de entrada para información fótica; e) vías de entrada de tipo no fóticas. B. La vía de entrada retiniana parece depender de una combinación de fotorreceptores y fotopigmentos. C. Dentro de las vías no fóticas pueden considerarse aferencias del tálamo (IGL), del rafe y de la glándula pineal a través de la melatonina.

Los componentes neurales más importantes del sistema circadiano de los mamíferos pueden resumirse en la figura 13. Las aferencias a los NSQ las constituyen las vías directas de llegada de la información fótica, el haz RHT desde la retina, y el haz genículohipotalámico (GHT) desde la lámina intergeniculada lateral (IGL) del tálamo. Además, desde el mesencéfalo, los núcleos del rafe medio proyectan directamente hacia los NSQ, y los núcleos del rafe dorsal lo hacen indirectamente vía una proyección a los IGL. Entre las eferencias desde los NSQ se cuentan la innervación al núcleo paraventricular del hipotálamo, y a la zona subparaventricular, una proyección a los ganglios cervicales superiores (GCS) que proyectan a su vez a la glándula pineal.

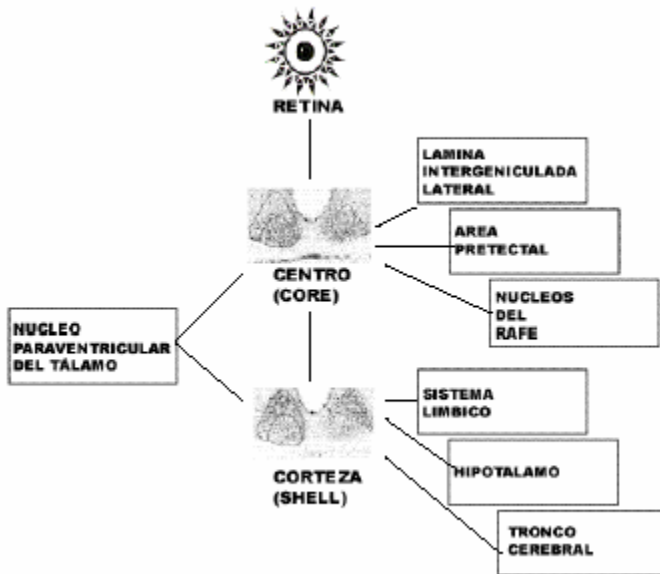


FIGURA 13. Aferencias principales de los NSQ. Como se verá más adelante, los NSQ pueden subdividirse en una zona ventromedial (core) y una dorsolateral (shell).

Los neurotransmisores implicados en cada vía son aminoácidos excitatorios como el glutamato del haz RHT, el ácido gamma aminobutírico (GABA) y neuropéptido Y (NPY) del haz GHT, y la serotonina (5-HT) de los núcleos del rafe.

4.1. Marcapasos o reloj central: localización y neuroanatomía

El reloj circadiano central en los mamíferos está ubicado en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo, inmediatamente por encima del quiasma óptico (Fig. 14) Las primeras evidencias acerca de su localización fueron publicadas en 1972 por R.Y. Moore y su grupo colaborador, es decir, hace poco más de treinta años, lo que demuestra la relativa juventud de la cronobiología como disciplina.

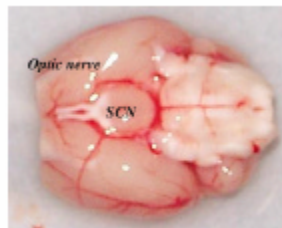


FIGURA 14. Vista ventral de un cerebro de hámster en el que se observan los nervios ópticos que se cruzan en el quiasma óptico. Este último se encuentra en una posición inmediatamente ventral a los NSQ.

Este oscilador central está conectado a un sensor de luz prominente, que es la retina. También está conectado de múltiples maneras a sus efectores, que pueden ser otras áreas cerebrales cruciales en la secreción de hormonas como la eminencia media, o en el control de comportamientos como la actividad locomotora, el sueño, la alimentación o la ansiedad. El reloj se conecta con sus efectores mediante tractos nerviosos, es decir, mediante una conexión neural, y también mediante la secreción de factores humorales.

En los mamíferos, si bien los NSQ no constituyen el único reloj posible, sí puede decirse que es el que dirige la ritmicidad circadiana en forma predominante, aún controlando la ritmicidad de otros relojes secundarios o esclavos.

4.2. Evidencias de que los NSQ constituyen el reloj central en mamíferos

- a) Lesiones: Al destruir completamente (mediante, en general, lesiones electroquímicas bilaterales) los NSQ, se pierden la mayoría de los ritmos circadianos, o al menos los más importantes. Así, en vez de ocurrir con máximos y mínimos periódicos, las funciones del organismo tienden a presentarse en forma

anárquica, al azar, distribuidas a lo largo del ciclo, en un patrón que se conoce como "arritmicidad". (Fig. 15)

- b) Transplantes: Al transplantar el tejido correspondiente a los NSQ de un animal en el sitio donde se encontraban los NSQ en un animal lesionado, la condición de arritmicidad revierte en la recuperación de los ritmos biológicos, con el período del animal dador del tejido. (Fig. 16)
- c) Explantes y cultivo celular: Al extirpar los NSQ *"in toto"*, como explantes, y mantenerlos en cultivo, estos poseen ritmos cuantificables (como el de actividad eléctrica espontánea) que se mantienen en tanto dure el cultivo del tejido, como un verdadero reloj *in vitro*. Lo mismo ocurre con las células de los NSQ, aún cuando se cultivan en forma aislada. Vale decir que cada célula de los NSQ es un oscilador, o un pequeño reloj, en sí misma. (Fig. 17)
- d) Conexión directa con un sensor fótico: Los NSQ están directamente conectados a la retina, el sensor de luz más importante del cuerpo, mediante el haz retinohipotalámico, e indirectamente a través del haz genículohipotalámico, que los conecta a la lámina intergeniculada lateral del tálamo, que también recibe información de la retina. Dado que la luz es el dador de tiempo más importante, una conexión directa con el órgano que recibe y procesa el estímulo es fundamental para "poner en hora" el reloj.

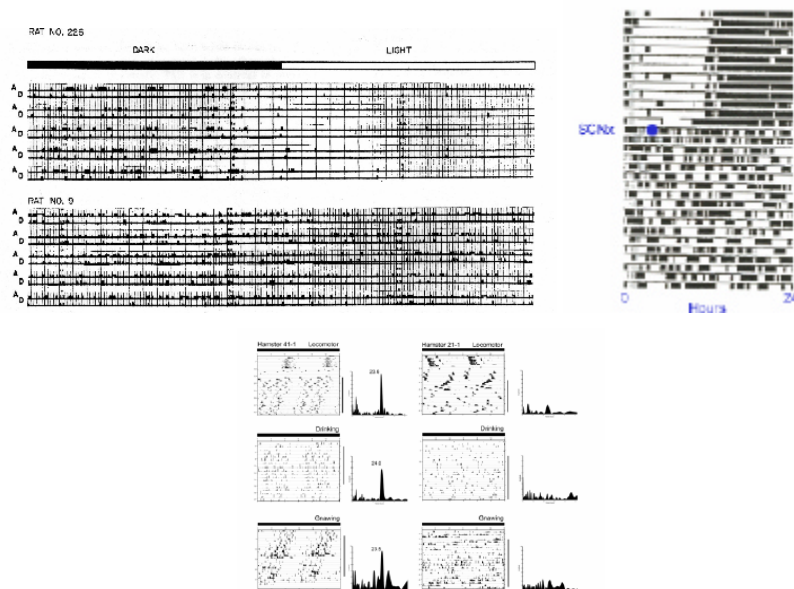


FIGURA 15. A,B. La lesión bilateral de los NSQ produce arritmicidad circadiana. En este caso se observa la pérdida del ritmo de actividad locomotora en la rata de acuerdo con la primera experiencia de lesiones de NSQ (Stephan & Zucker, 1972). C. Pérdida de ritmos de correr, beber y roer en el hámster dorado luego de la lesión de los NSQ.

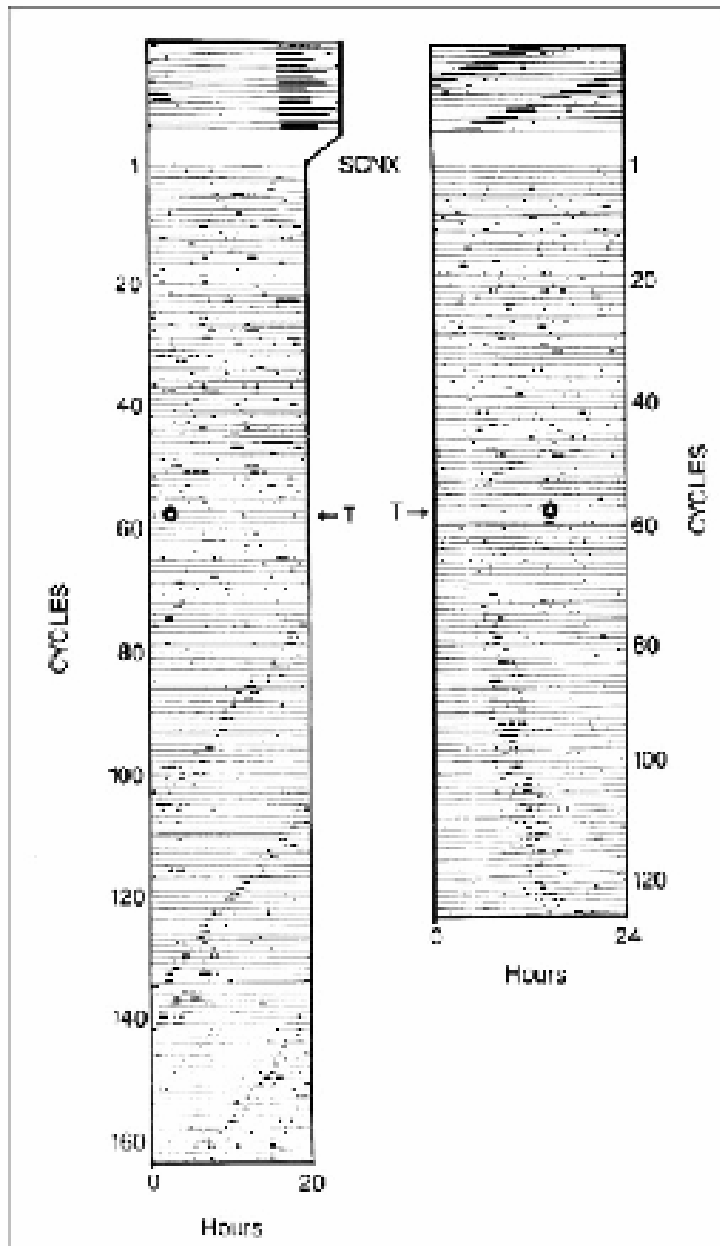


FIGURA 16. El transplante de tejido fetal conteniendo los NSQ restaura los ritmos circadianos de actividad locomotora perdidos debido a lesiones previas del área. SCNx representa el día de la lesión de los núcleos supraquiasmáticos en un hámster mutante *tau* (nótese que en el panel de la derecha se representan días circadianos de 20 horas de duración), mientras que el día marcado con un círculo azul indica el momento de transplante de tejido conteniendo NSQ de un animal salvaje. Se nota que se recupera el ritmo circadiano de actividad locomotora, pero de característica diferente a la original. EL panel de la derecha muestra lo mismo pero graficado en días de 24 horas.

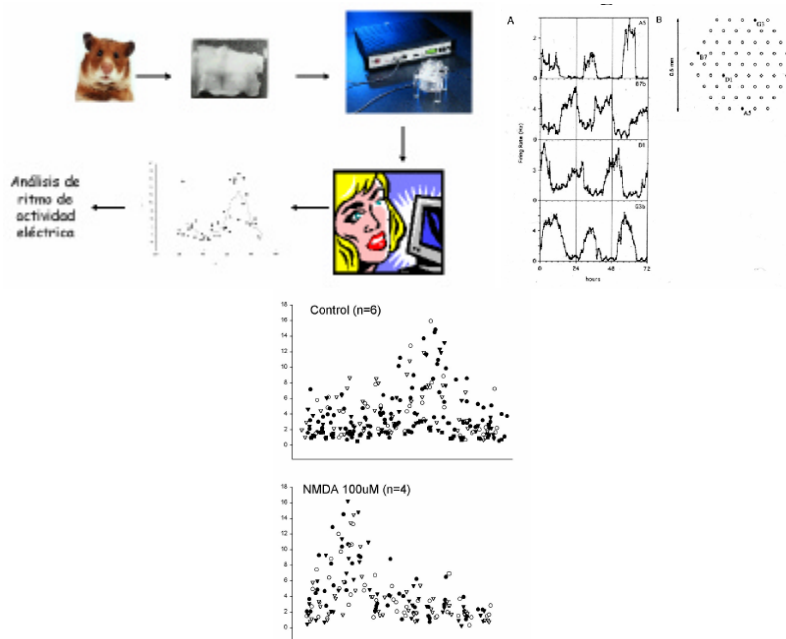


FIGURA 17. A. En condiciones de explanto y aislamiento los NSQ siguen manteniendo ritmos circadianos, por ejemplo, de actividad eléctrica neuronal. En la figura se representa la obtención de una rodaja de cerebro de hámster de la zona hipotalámica, que contiene los NSQ. Esta rodaja se puede mantener en condiciones controladas de cultivo mientras se registra la frecuencia de potenciales de acción de las neuronas y así comprobar el ritmo de actividad eléctrica de la zona supraquiasmática. EL gráfico muestra la actividad eléctrica de unidades neuronales en la zona de los NSQ, que presenta un pico a lo largo del día. B. Actividad eléctrica de neuronas dispersas de NSQ cultivadas sobre una red de microelectrodos (esquemático en el panel de la derecha). Cada célula mantiene un ritmo circadiano de frecuencia de disparo de potenciales de acción independiente de las otras, como se muestra en el panel de la derecha. C. Registro de actividad eléctrica en fetos de hámsteres dorados conteniendo los NSQ. Los controles muestran el pico normal de actividad alrededor de ZT6 (mediodía), y el efecto del tratamiento con NMDA, un agonista glutamatérgico que reproduce el avance de fase inducido por la luz sobre la fase de los ritmos (Modificado de Yannielli and Harrington, 2000)

Los NSQ contienen aproximadamente 16000 neuronas, pequeñas y densamente empaquetadas junto con otras células de sostén como las células de la glía. Esta densidad hace que los núcleos sean identificables fácilmente en preparados histológicos, y aún en cortes frescos. Estructuralmente no son homogéneos: existen por lo menos dos zonas citoquímicamente bien diferenciadas conocidas como centro (*core*) y corteza (*shell*).

La corteza es más bien dorsal o dorsomedial, y el centro ocupa la porción ventral y ventrolateral (FIG. 18) El centro se caracteriza por una alta densidad celular y por la presencia de **péptido intestinal vasoactivo (VIP)** y **péptido liberador de gastrina (GRP)** en sus neuronas. Asimismo, esta zona está enriquecida en aferencias retinianas tanto directas (RHT) como indirectas (provenientes de la IGL y el núcleo de rafe).

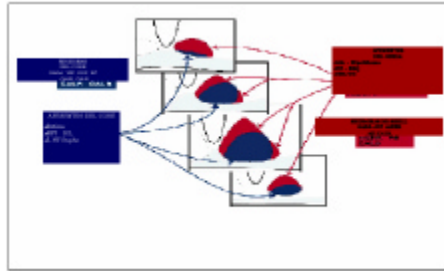


FIGURA 18. Subdivisiones neuronales de los NSQ y sus aferencias. Los distintos gráficos ejemplifican la distribución a lo largo del eje antero-posterior. En azul se destaca el *core* y en rojo el *shell*. Modificado de Abrahamson & Moore, 2001.

Por otro lado, la región corteza contiene neuronas inmunorreactivas para **Arginina Vasopresina (AVP)** y neurofisiña; la densidad celular, asimismo, es menor que la observada en el centro. En este caso, prácticamente no hay proyecciones retinianas pero sí de otras zonas cerebrales, y del centro.

Estas observaciones apoyan la idea que el centro recibe principalmente señales de tipo fóticas, críticas para la sincronización del marcapasos al ciclo L-O, mientras que la corteza recibe aferencias no fóticas de tipo modulatorias. Por otro lado, la región corteza recibe las proyecciones del centro y por lo tanto esta zona podría modular las salidas del reloj de acuerdo a las señales recibidas en el centro.

Además, ambas regiones contienen GABA, angiotensina II y factor liberador de tirotrófina (TRF). Otra característica de los NSQ de mamíferos es la gran abundancia de astrocitos que presentan. Se estima que la relación existente entre la cantidad de astrocitos y neuronas es tal que hay un astrocito cada tres neuronas. Se sabe que diversos parámetros gliales, como la expresión de la proteína GFAP (“glial fibrillary acidic protein”, específica de astrocitos), posee un claro ritmo diario y circadiano en los NSQ (FIG. 19). Una de las preguntas pendientes en el estudio del reloj circadiano es el papel que juegan estos astrocitos en la regulación de los ritmos biológicos.

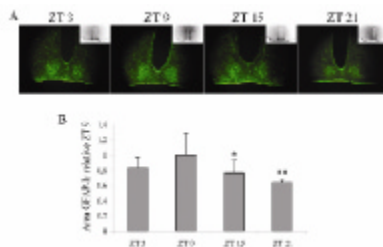


FIGURA 19: Ritmo de GFAP en astrocitos en los NSQ. Durante la fase de oscuridad, los niveles de este marcador específico de astrocitos dentro del reloj son significativamente menores que durante la fase de luz (Leone y Golombek, inédito, 2005)

4.4. Vías de entrada al reloj

Como los trasplantes de SCN son capaces de devolver la ritmicidad circadiana en animales lesionados, incluso cuando el trasplante se encuentra encapsulado en una membrana semi-permeable y solo puede liberar factores de tipo humoral para comunicar señales, se concluyó que parte de las conexiones o salidas del reloj no eran de tipo neural sino que se realizaban por la liberación de factores difusibles. Estudios específicos han mostrado que los SCN proyectan hacia neuronas liberadoras de la hormona de crecimiento (GnRH) y a neuronas que contienen receptores nucleares para estrógeno, modulando de esta manera el ciclo reproductivo en las hembras y la producción de testosterona en los machos. Asimismo, proyectan hacia grupos celulares en los núcleos paraventriculares del hipotálamo que son activados por el estrés, modulando así la respuesta de corticosterona y a neuronas dopaminérgicas implicadas en la regulación de la liberación de prolactina en la región tuberoinfundibular. También es notable la proyección de los NSQ a neuronas que proyectan a los sistemas autonómicos simpático y parasimpático, controlando la variación circadiana en la actividad de la glándula pineal, adrenales, páncreas, y del hígado, ovarios y otros órganos. Esto se logra a través de sinapsis con neuronas ubicadas debajo del PVN y dentro del núcleo dorsomedial del hipotálamo, importantes para la transmisión de información relacionada con el ciclo sueño-vigilia, así como con conexiones a neuronas magnocelulares involucradas en la secreción neurohipofisaria de hormonas. De este modo, los NSQ poseen cuatro tipos de conexiones por medio de las cuales pasan las señales relativas a la organización temporal: directas con neuronas neuroendocrinas, directas con neuronas autonómicas que transmiten la señal del reloj a los distintos órganos, con estructuras hipotalámicas que se encuentran entre el reloj y el PVN que podrían servir de intermediarios entre los NSQ y las neuronas neuroendocrinas y autonómicas, y áreas fuera del hipotálamo que sincronizan comportamientos controlados por el hipotálamo tales como la actividad locomotora.

4.6. Un ejemplo de transmisión neural de la señal rítmica del reloj: Regulación de la secreción de la melatonina pineal.

La glándula pineal secreta la hormona melatonina, considerada como la hormona de la oscuridad, ya que tiene un máximo durante la noche, y ha sido implicada en la regulación del sueño y los ciclos estacionales. El modo en que los NSQ comunican a la pineal el fotoperíodo (en este caso el largo de la noche, o fase de oscuridad) es mediante una conexión que sale de los NSQ hacia el núcleo paraventricular del tálamo (PVT) y la estación de relevo autonómica del ganglio cervical superior. Desde allí, las fibras noradrenérgicas inervan a la pineal, donde los receptores adrenérgicos alfa y beta regulan a las enzimas que participan en el metabolismo de la melatonina (FIG. 21)

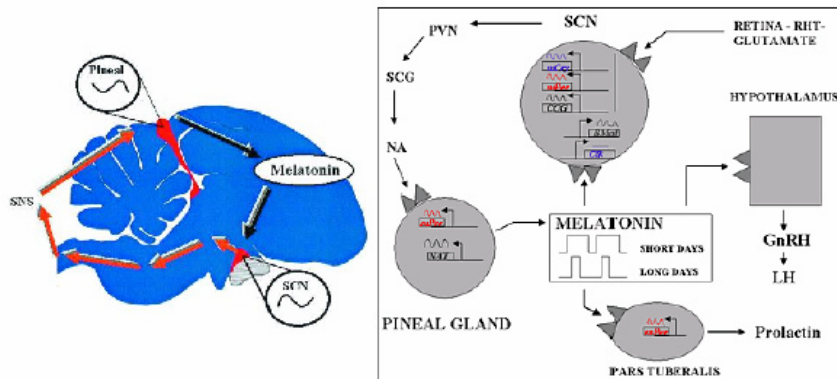


FIGURA 21: Control de la melatonina pineal por los NSQ. El reloj proyecta indirectamente a la glándula pineal a través de estructuras intermedias, como el PVN y el ganglio cervical superior. La inervación que llega a la pineal es noradrenérgica, y la liberación de NA induce la secreción de melatonina. Esta, a su vez, es capaz de llevar al reloj la información concerniente al fotoperíodo, más específicamente, al largo de la fase de oscuridad.

4.7. Neuroquímica del reloj

El neurotransmisor principal del reloj es el ácido gamma amino butírico (GABA). Este compuesto es reconocido como un neurotransmisor inhibitorio en el SNC, debido a que la unión del mismo a su receptor provoca la apertura de canales iónicos de cloruro, con la subsiguiente entrada de estos iones y la hiperpolarización de la membrana neuronal (FIG 22). Sin embargo, se ha postulado que en los NSQ el GABA tendría efectos diferentes a lo largo del día. Durante la noche su efecto sería inhibitorio, pero de día se transformaría en un neurotransmisor excitatorio. Esto sería consecuencia de un cambio en la concentración extracelular de iones cloruros: si el gradiente favorece la salida de estos iones, la apertura de los canales iónicos dependientes de GABA provocará una despolarización de la membrana generando potenciales de acción. Aún hay mucha controversia sobre el efecto del GABA en el reloj, y su papel en los procesos de comunicación inter-celular.

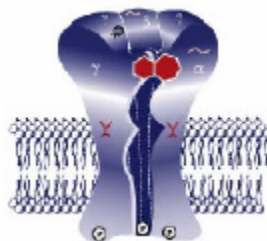


FIGURA 22: Esquema del canal de cloro de GABA. Este receptor puede ser modulado por drogas farmacológicamente importantes en la clínica como las benzodiacepinas y los barbitúricos.

4.8. Un reloj de bolsillo: los NSQ *in vitro*, y los osciladores celulares.

Los NSQ presentan ritmos circadianos en su actividad eléctrica espontánea (ritmo de disparo de sus células), y en su metabolismo, y estos dos ritmos tienen un máximo de expresión durante la fase diurna. Tanto en condiciones constantes como en condiciones de cultivo (donde necesariamente los NSQ se encuentran aislados de cualquier conexión con los estímulos externos como la luz) estos ritmos persisten, si bien con el periodo endógeno o real del reloj (FIG 17). Esta condición de cultivo *in vitro* es particularmente útil para estudiar los mecanismos más básicos del reloj, ya que permite medir un ritmo (como por ejemplo el de actividad eléctrica por medio de un registro electrofisiológico) en respuesta a distintas drogas que representan en el experimento a los mediadores químicos de los estímulos que llegan al reloj *in vivo*. En esta preparación, no sólo se mantienen oscilando en el tiempo los ritmos básicos del reloj, sino también los mecanismos neuroquímicos, las cascadas de segundos mensajeros, y las respuestas y mecanismos genéticos y moleculares que hacen a la maquinaria del reloj en sí, es decir, a la oscilación primaria y a los procesos de sincronización. Suele para esto prepararse una rodaja de cerebro que contiene los NSQ, y esa rodaja se cultiva en una cámara por la que circula líquido cefalorraquídeo artificial junto con oxígeno, a una temperatura controlada. Así, el tejido puede mantenerse en condiciones aceptables para la medición de un ritmo durante varios días. Un ejemplo: no solamente la luz como estímulo dado al animal vivo induce un cambio en la fase de la oscilación del reloj, sino que, en el reloj en cultivo (los NSQ extraídos quirúrgicamente del cerebro y mantenidos con el medio líquido y gaseoso apropiado) el neurotransmisor glutamato (que media los efectos de la luz) produce el mismo desplazamiento de la fase, tanto como la estimulación eléctrica de los nervios ópticos (que libera glutamato en los terminales de las células ganglionares). Incluso, un pulso de luz administrado *in vivo*, previamente a la preparación de la rodaja de cerebro que contiene los NSQ para cultivar, induce un cambio en la fase similar al de la luz cuando se registran los ritmos de actividad eléctrica del reloj ya en cultivo por un día. En general, las respuestas del reloj *in vitro* e *in vivo* son similares, sólo que la modulación a la que está sujeto se pierde en las condiciones de cultivo, y las respuestas muchas veces se observan con mayor o menor intensidad, debido justamente a la pérdida de estos efectos moduladores en la rodaja de cerebro (FIG. 23).

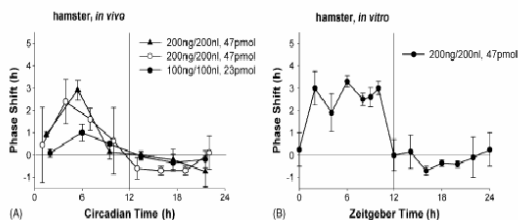


FIGURA 23: Comparación resultados *in vivo/in vitro* de estimulación de los NSQ. Izquierda: avances de fase inducidos por neuropéptido Y conteniendo los NSQ, según datos de Biello y Mrosovsky, 1996 (triángulos), Albers y Ferris, 1984 (círculos abiertos) y Huhman y Albers, 1994 (círculos cerrados). Nótese que NPY induce un avance de fase dosis-dependiente a CT 6. Derecha: efecto de la estimulación con NPY a rodajas hipotálamicas conteniendo los NSQ (Harrington y Schak, 2000), con avances de fase a CT 6 y una distribución amplia de efecto durante el día.

Sin embargo, el patrón circadiano de actividad no es una propiedad del tejido en su conjunto, sino que puede reducirse aún más, a la actividad eléctrica periódica de cada una de las células del reloj (FIG. 17). El comportamiento resultante (y por ejemplo el período de la oscilación) es un promedio de los comportamientos de cada una de las células que componen los NSQ. Todavía resta conocer cuáles son los mecanismos por los cuales estas células se comunican, estableciendo una sola oscilación maestra que imparte una ritmicidad única a todo el resto del cuerpo.

El hecho de que cada neurona del reloj sea un reloj diminuto en sí mismo no es trivial: esto ha permitido reducir el modelo experimental a células aisladas, y de este modo establecer los eventos moleculares y genéticos que llevan al proceso de oscilación y al de su sincronización por la luz. Estos mecanismos se verán con detalle en otros capítulos de este libro.

5. La puerta de entrada: vías de sincronización de los NSQ

5.1. Modelos de sincronización en mamíferos

Cuando la variable que se registra es actividad locomotora, el actograma es la representación más habitual. En el caso de un animal nocturno bajo condiciones cíclicas de Luz-Oscuridad (L-O), podemos observar actividad durante la fase oscura, donde el comienzo de la actividad está dado por el apagado de las luces, teniendo el ritmo un período exacto de 24 horas. Si se elimina el estímulo del zeitgeber, que en este caso es la luz, se observa que en curso libre (*free-running*), el período con el cual comienza la actividad locomotora corresponde al período endógeno dado por el reloj biológico. La Figura 24 es la representación de un actograma donde cada línea corresponde a 48 horas y la actividad se representa con una barra negra. En este ejemplo se observa que en condiciones de curso libre el comienzo de la actividad sucede cada día un poco más tarde, por ser el período endógeno (?) mayor de 24 horas. En condiciones constantes, el animal, dada la ausencia de señales ambientales, mantiene sus ritmos según la hora que le indica su reloj biológico: podemos así hablar de *día subjetivo* (aquel momento en que el animal supone que es de día) y *noche subjetiva* (cuando su reloj biológico le indica que debería ser de noche).

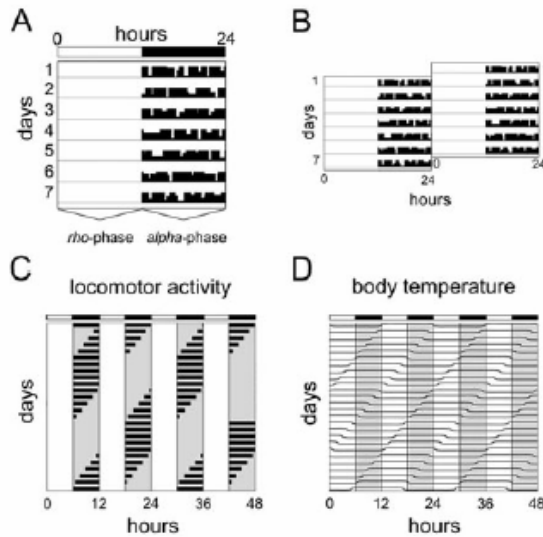


FIGURA 24: Esquema de actograma que muestra: (A) Ritmo de actividad locomotora sincronizada a un ciclo luz-oscuridad (se indican las fases de actividad –alfa – y de reposo – rho). (B) El mismo actograma pero en gráfico doble, para visualizar mejor fase y período. (C) Actograma esquemático de un animal nocturno mantenido bajo condiciones de fotoperíodos cortos (LD 6:6). Existe una aparente sincronización de la actividad locomotora. (D) El registro simultáneo de la temperatura corporal (en libre curso) demuestra que la actividad locomotora del panel (c) está en realidad enmascarada por el sincronizador. (Modificado de Jud et al., A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions. Biol Proced Online 7:101-16, 2005).

La sincronización puede estar dada por gran variedad de estímulos que pueden adelantar o atrasar al reloj, dependiendo del momento en que se los aplica. Para poder observar cómo un estímulo es capaz de afectar al reloj y sincronizarlo se debe trabajar en condiciones constantes.

Si se aplica un pulso de luz al comienzo de la noche subjetiva se produce un retraso en el comienzo de la actividad en los días sucesivos; en cambio, si se le aplica al final de la noche subjetiva se logra un adelanto, tal como se representa en la Figura 25.

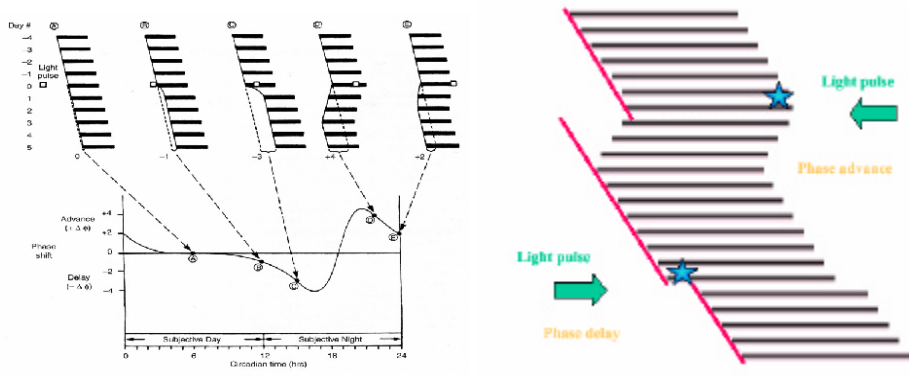


FIGURA 25: Representación de una curva de respuesta de fase. Se indica la hora circadiana a la cual se administra el pulso de luz y, en ordenadas, la respuesta de fase (por convención se indican avances como positivos y retrasos como negativos). Se nota que pulsos de luz al comienzo de la noche indiquen retrasos, mientras que hacia el final de la noche inducen adelantos de fase. Los Actogramas de la parte superior esquematizan la respuesta del ritmo de actividad locomotora.

Los cambios de fase pueden representarse como una curva de respuesta de fase (CRF), donde se presenta en el eje de las ordenadas la hora del reloj biológico en la que se aplica el estímulo y en el eje de las abscisas la magnitud del cambio. Debemos introducir en este momento el término hora circadiana (CT, por *circadian time*): se define como hora circadiana 12 (CT=12) al comienzo de la noche subjetiva, es decir el equivalente al momento de apagado de las luces, que puede reconocerse en animales nocturnos en condiciones constantes como el momento de comienzo de la actividad locomotora. Por analogía se define la hora 12 en condiciones de L:O al momento de apagado de las luces, indicándose como ZT=12 (por *Zeitgeber time*).

Para cada tipo de organismo existe una curva de respuesta de fase según el estímulo aplicado. De este manera los estímulos se agrupan en aquellos de tipo fótico, cuyas CRF se asemejan a la de la luz, y no fóticos, cuya CRF es diferente a la lograda por el estímulo luminoso. La Figura 26 representa las CRF fóticas y no fóticas para el hámster, donde la variable medida es el cambio de fase de la actividad locomotora. Dentro de los estímulos no fóticos se encuentran la presentación de una nueva rueda giratoria, el cambio de jaula, la introducción de un nuevo animal dentro de la jaula, la estimulación de la IGL talámica o la administración de neuropéptido Y. La mayor diferencia encontrada entre ambas curvas de respuesta de fase es el momento en que se observan los cambios de fase: los estímulos fóticos producen principalmente cambios durante la noche subjetiva, mientras que los estímulos no fóticos lo hacen durante el día subjetivo.

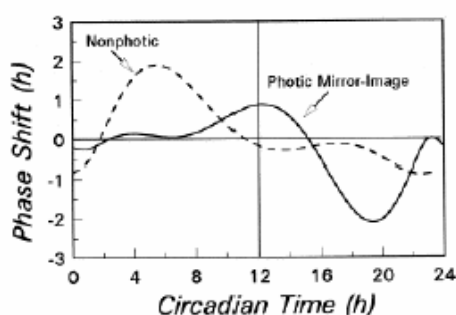


FIGURA 26. Esquema de curva de respuesta de fase fótica (línea llena) y no fótica (línea quebrada).

Ahora que ya sabemos dónde está ubicado el reloj biológico, y brevemente cómo es posible ponerlo en hora, podemos dedicarnos a ver los mecanismos que mueven las agujas del reloj. Durante los años 80 y principios de los 90 poco se sabía de los mecanismos moleculares del reloj, pero se identificaron gran cantidad de genes

relacionados con la ritmicidad en los NSQ. Algunos de ellos son genes de expresión inmediata temprana (IEGs por *Immediate-Early Genes*) y se activan en el proceso de puesta en hora del reloj por estímulos externos. En relación con la expresión de genes tempranos se demostró a comienzos de los años 90 que Fos (producto del gen de expresión temprana *c-fos*) presentaba un ritmo circadiano en los NSQ y, además, la inducción de *c-fos* presentaba una curva de respuesta de fase que coincidía con la curva de respuesta de fase a la luz. Otros genes de expresión temprana fueron luego descritos en los NSQ, como *cjun*, *jun-B*, *jun-D*, *NGFI-A* y *NGFI-B*. Sin embargo, existen situaciones en las cuales se afecta la fase del reloj sin modificar la expresión de IEGs, e incluso en animales con una mutación nula para *c-fos* la sincronización es normal, sugiriendo que estos genes no son imprescindibles para el funcionamiento del reloj circadiano. Junto con la inducción de genes tempranos se observó que el factor de transcripción CREB es fosforilado luego de un pulso de luz (administrado durante la noche subjetiva). Más recientemente fue señalado que la luz afecta la expresión o actividad de los genes reloj; este efecto también está influido por la hora de aplicación del estímulo: por ejemplo, la luz induce un aumento de los niveles de *per1* y *per2* durante la noche subjetiva, pero no durante el día (ver capítulo XXX).

5.2. Vías de transducción de señales

Como describimos anteriormente la información fótica es llevada a los NSQ desde la retina por el tracto retino hipotalámico (TRH), liberándose glutamato en los NSQ, junto con otros neurotransmisores y moduladores. La aplicación de agonistas de los receptores de glutamato en los NSQ produce el mismo efecto que la luz y los antagonistas bloquean su efecto. Además de la vía directa, la luz puede afectar a los NSQ vía el tracto genículo hipotalámico (TGH) a través del neuropéptido Y (NPY).

La estimulación por glutamato en los NSQ inicia una cadena de eventos ligados al influjo de calcio en las neuronas. Así, se activa una proteína quinasa dependiente de calcio (CaM quinasa de tipo II) así como la enzima que sintetiza óxido nítrico (NOS); el bloqueo farmacológico de estas proteínas inhibe los cambios de fase inducidos por luz. Recientemente se ha encontrado que otro mensajero gaseoso, el monóxido de carbono (CO) también participa en los mecanismos de sincronización circadiana.

En los mecanismos de sincronización del reloj biológico se activan e inhiben diferentes vías de señalización que permiten la expresión de genes y los cambios permanentes observados en los ritmos. Las variaciones observadas en los niveles de AMPc y GMPc en hipotálamo impulsaron la búsqueda de la función de los nucleótidos cíclicos y las quinasas dependientes de ellos en los diferentes mecanismos del reloj biológico. Experimentos *in vitro* demostraron que tanto el GMPc y como el AMPc poseían una sensibilidad temporal para la sincronización del reloj. Más tarde el uso de bloqueantes de PKG *in vivo* demostró la participación de esta quinasa en los mecanismos de sincronización fótica. También se ha demostrado la participación de otras vías de transducción de señales en la sincronización circadiana, como la representada por la familia de las MAP quinasas.

Lo más interesante es que las vías de transducción de señales responsables de retrasos y avances de fase son diferentes. Diversas líneas experimentales permiten resumir las vías respectivas en la Figura 27: los retrasos de fase estarían relacionados con la movilización de reservorios intracelulares de calcio mientras que los avances se relacionan con la activación de la guanilato ciclasa y de la proteína quinasa dependiente de GMPc. Si bien aún se desconoce el acoplamiento preciso de estas vías con los genes reloj en los NSQ

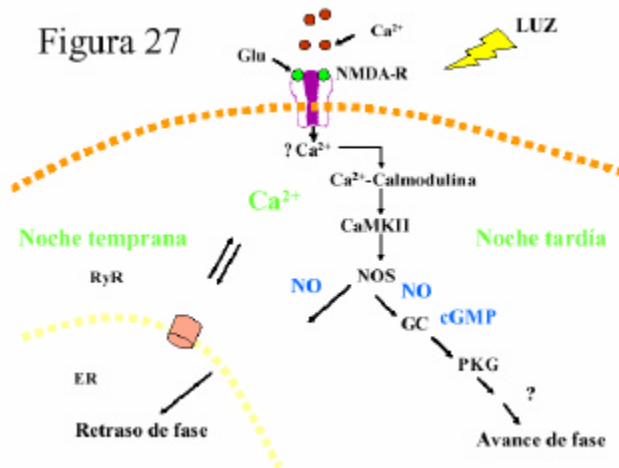


FIGURA 27: Esquema de vías de transducción para avances y retrasos de fase inducidos por luz (ver texto para la explicación de las vías).

6. La vía de escape: acoplamiento y eferencias del reloj

6.1. Evidencias neurales y humorales

Los NSQ controlan los ritmos circadianos a través de vías neurales y humorales. Es interesante notar que su localización hipotalámica le permite vías directas a núcleos vecinos que controlan una buena parte de las funciones homeostáticas del organismo. Se han realizado diversos experimentos de trazadores que permiten estudiar las vías neurales eferentes del reloj, hallándose una red de conexiones a diversas zonas del cerebro, comenzando por el área retroquiasmática y el área subparaventricular y llegando a otras zonas hipotalámicas (como el núcleo paraventricular, PVN) o a la hojuela intergeniculada. Cada una de estas conexiones está relacionada con el control de diferentes ritmos: la lesión del PVN inhibe el ritmo de secreción de melatonina pineal, la zona rostral a los NSQ abole el pico de LH y la lesión del área retroquiasmática afecta al ritmo de actividad locomotora.

A través de experimentos de trasplantes se han realizado quimeras entre animales salvajes y mutantes *tau*: el ritmo de actividad resultante indica que tanto el NSQ del hospedador como el transplantado participan en la determinación de los parámetros del ritmo controlado. También se han realizado trasplantes de NSQ encapsulados de forma tal que permita una comunicación humoral pero no neuronal entre el trasplante y el hospedador. En este caso se comprobó que el trasplante es capaz de restablecer los ritmos circadianos de actividad locomotora en

animales cuyo NSQ había sido lesionado, sugiriendo que la eferencia humoral del supraquiasmático transplantado era suficiente como para generar dichos ritmos.

6.2. Modelo de partición (splitting)

Hace ya muchos años Colin Pittendrigh propuso que el reloj circadiano de mamíferos estaría constituido por la interacción entre al menos dos osciladores: M (por *morning*, mañana) y E (por *evening*, noche). Un modelo experimental de esta hipótesis es el fenómeno de *splitting*, mediante el cual, ante ciertas condiciones ambientales (en particular, luz constante durante períodos prolongados), el ritmo de actividad locomotora del hámster presenta dos componentes claramente diferenciados, que pueden tener períodos diferentes (sugiriendo que están controlados por osciladores distintos). Recientemente se demostró que durante esta partición de la actividad locomotora los NSQ derecho e izquierdo se comportan en forma independiente, en antifase uno del otro (FIG 28)

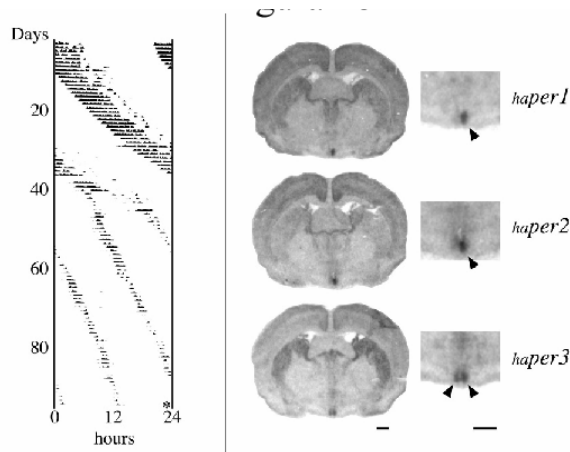


FIG. 28: Panel izquierdo: actograma que representa el fenómeno de partición (*splitting*) en un hámster sujeto a condiciones de luz constante. Nótese cómo a partir del día 40 la actividad locomotora se fragmenta en dos componentes claramente diferenciados. Panel derecho: Cortes de cerebro de hámster demostrando la expresión de los genes reloj *per 1* y *per 2* en un solo NSQ en forma alternada para cada componente de la partición. (Tomado de de la Iglesia et al., Science 290: 799-801, 2000).

7. Mutantes y quimeras para entender al reloj

El hámster mutante *tau* representó un punto de inflexión en nuestro entendimiento del sistema circadiano de mamíferos (véase “Historia de un descubrimiento”). Además de haber aportado evidencias adicionales acerca de la naturaleza genética de la determinación del período de los ritmos circadianos (dado que se trata de un mecanismo de dominancia incompleta en el que el homocigoto para la mutación presenta un período intermedio –

22 h -entre el salvaje de 24 h y el homocigoto mutante de 20 h), permitió una de las pruebas definitivas para asegurar que los NSQ contienen un reloj circadiano. Esto se consiguió mediante los trasplantes cruzados entre mutantes y salvajes, observándose que el ritmo recuperado en animales con NSQ lesionados siempre depende del genotipo del trasplante (FIG 16). Años más tarde se descubrió que la mutación *tau* correspondía al gen de la Caseína Quinasa I epsilon (CK1e), una enzima que participa del mecanismo molecular del reloj circadiano (ver capítulo XXX).

Dado que el hámster no es un buen modelo para estudios genéticos y moleculares, se puso un particular énfasis para obtener un ratón mutante en cuanto a la expresión de sus ritmos biológicos, esfuerzo que fue coronado en 1994 con la aparición del mutante *clock*, un ratón que inicialmente muestra un período largo de actividad locomotora y que, en el caso del homocigoto, se vuelve arrítmico al cabo de unos cuantos ciclos. A partir de este fenotipo mutante se aisló el gen correspondiente, que resultó ser otro componente fundamental de la maquinaria molecular del reloj. Actualmente se han generado y analizado otros mutantes (en la mayoría de los casos, producidos en el laboratorio) de ritmos circadianos en ratones, en busca de nuevos componentes genéticos del reloj biológico.

A través de largos y complejos experimentos se han producido ratones quiméricos con proporciones variables de células de NSQ de animales normales y otras de animales mutantes. Esta variabilidad se observó también en el fenotipo de los ritmos circadianos de actividad locomotora de los ratones quiméricos, que mostraron una gradación de comportamientos entre el salvaje y el mutante (FIG 29). Esto indica que las células de la quimera interactúan para generar el período del ritmo controlado.

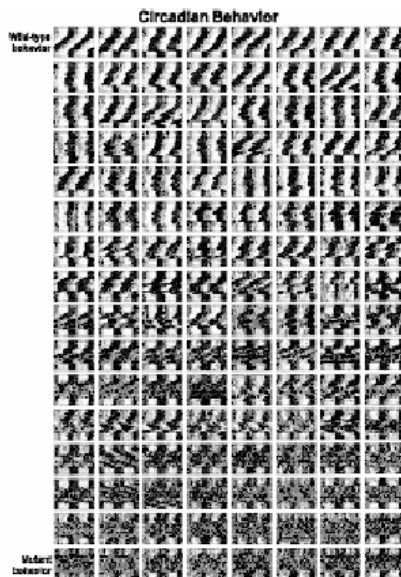


FIG. 29: Quimeras circadianas: fenotipos intermedios correspondientes a animales con diverso grado de heterogeneidad genética entre genotipo normal y mutante *clock* (de Low-Zeddies y Takahashi, Cell Vol. 105, 25-42, 2001).

8. Las ventajas de un sistema circadiano

En general el mundo es altamente fidedigno en darnos la hora del día (con algunas excepciones: ver "Historia de un descubrimiento"); en este sentido, resultaría suficiente con respuestas puramente reactivas a los estímulos ambientales (enmascaramiento). Sin embargo, la presencia universal de osciladores autónomos apunta a una clara ventaja adaptativa de la capacidad de predicción temporal. ¿Cómo demostrar que la selección natural mantuvo al sistema circadiano de mamíferos por tratarse de una clara ventaja? Para esto se requiere realizar experimentos a campo abierto. Una de las investigadoras pioneras en cronobiología, Pat De Coursey, decidió realizar dos experimentos para demostrar la necesidad del oscilador circadiano. Para ello, estudió el comportamiento de ardillas "antílope" y de ardillas listadas (*chipmunks*); a un grupo de los animales se les lesionaron los núcleos supraquiasmáticos, y junto con otro grupo de animales control, fueron liberados nuevamente en el ambiente del que provenían, provistos de un sensor para determinar su actividad a distancia. En ambos casos los animales con lesión del reloj biológico fueron depredados en mayor proporción, dado que el sistema de predicción y sincronización de los animales intactos les permitió escapar de sus enemigos (FIG. 30) Asimismo, el sistema circadiano permite la adaptación a ambientes extremos (polares, desérticos, cavernícolas, etc.) y es lo suficientemente plástico como para responder a los cambios del organismo y del ambiente.

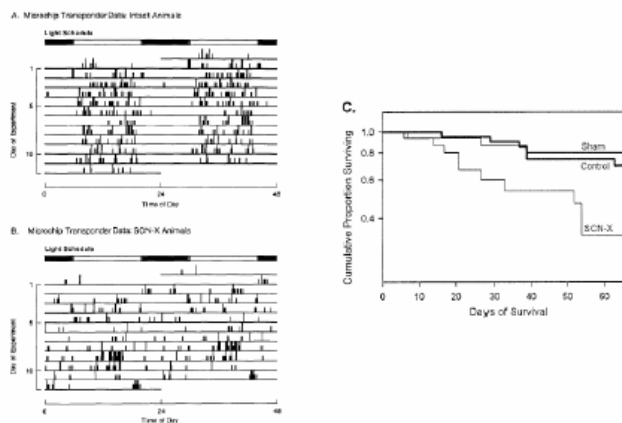


FIG. 30: Los animales con lesiones en los NSQ presentan signos de arritmicidad en el campo y son susceptibles de una mayor mortalidad. Panel izquierdo: ardillas antílope con lesión de NSQ presentan un patrón de baja ritmicidad en el campo (DeCoursey et al., *Physiol Behav* 62: 1099-1108, 1997). Panel derecho: los *chipmunks* liberados al campo luego de lesiones en los NSQ son víctima de mayor predación al cabo de 80 días de experimentación (DeCoursey et al., *J Comp Physiol A* 186: 169-180, 2000).

Los desafíos futuros con respecto al estudio del sistema circadiano en vertebrados se centran en la elucidación de los mecanismos de oscilación y puesta en hora de los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos, así

como en el acoplamiento que permite controlar los ritmos. Por otro lado, nuevos modelos animales (tanto en campo como en laboratorio) permitirán expandir el conocimiento de estos mecanismos; en particular, en los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de la cronobiología de mamíferos diurnos, como el roedor *Octodon degus*. Asimismo, la relación entre los componentes centrales (RHT, NSQ) y los llamados "osciladores periféricos" del sistema circadiano es un tema a ser investigado.

9. Resumen

El sistema circadiano en mamíferos consta de un reloj central ubicado en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo (NSQ) y una variedad de osciladores periféricos localizados a lo largo del cuerpo. En este capítulo nos centramos en los NSQ, sus vías de entrada y sincronización y sus componentes de salida.

En otros organismos, como aves y reptiles, existen además otras estructuras capaces de funcionar como relojes autónomos (tales como la retina o la glándula pineal).

Los NSQ fueron identificados como relojes autónomos gracias a experimentos de neuroanatomía que determinaron que recibían una entrada directa desde la retina y diversos experimentos funcionales, incluyendo el hecho de que su trasplante es capaz de restaurar los ritmos perdidos por lesión de esta estructura. Estos núcleos se sincronizan, entre otros estímulos, por la luz solar, que pone en marcha una cascada de transducción de señales capaz de inducir retrasos o adelantos de fase del reloj, dependiendo del momento en que sean administrados. La base genética del funcionamiento de este reloj circadiano se encuentra en un ciclo de retroalimentación gobernado por los llamados genes reloj, cuyas mutaciones afectan los ciclos circadianos. Diversas evidencias indican que la presencia de este reloj circadiano en condiciones naturales ofrece una ventaja selectiva a sus portadores.

10. Lecturas adicionales

- Aguilar Roblero R, Granados Fuentes D, Caldelas I, Salazar Juarez A, Escobar C. Bases neurales de la cronobiología humana: el sistema circadiano distribuido. En: Golombek DA (ed.) Cronobiología Humana. Editorial Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, 2002.
- Aschoff J. Handbook of behavioral neurobiology, vol 4: Biological rhythms. Plenum Press, Nueva York, 1981
- Binkley S. The clock work sparrow. Time, clocks and calendars in biological organisms. Prentice Hall, Nueva Jersey, 1990.
- Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ. Chronobiology. Biological timekeeping. Sinauer Associates, 2004.
- Golombek DA (ed.) Cronobiología Humana. Editorial Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, 2002.
- Guido ME, de la Iglesia H. Bases moleculares de la cronobiología. En: Golombek DA (ed.) Cronobiología Humana. Editorial Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, 2002.
- Marques MD. Ritmos biológicos y ciclos ambientales: sincronización. En: Golombek DA (ed.) Cronobiología Humana. Editorial Universidad Nacional de Quilmes, 2002.
- Marques N, Menna Barreto L, Golombek DA (eds.). Cronobiología. Principios y aplicaciones. Editorial Universitaria de Buenos Aires (EUDEBA), Buenos Aires, 1997.

-Klein DR, Moore RY, Reppert S (eds.) *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*. Oxford University Press, Nueva York, 1991.

-Takahashi JS, Turek FW, Moore RY.(eds.) *Handbook of behavioral neurobiology* vol. 12: *Circadian clocks*. Kluwer Academic/Plenum, Nueva York, 2001.

10.2. Artículos

1. Albrecht U. The mammalian circadian clock: a network of gene expression. *Front Biosci*. 2004 9:48-55.
2. Berson DM. Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci*. 2003 26(6): 314-20.
3. Cassone VM, Menaker M. Is the avian circadian system a neuroendocrine loop? *J Exp Zool*. 1984 232(3):539-49.
4. DeCoursey PJ, Walker JK, Smith SA. A circadian pacemaker in free-living chipmunks: essential for survival? *J Comp Physiol [A]*. 2000 186(2):169-80.
5. Gillette MU, Mitchell JW. Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res*. 2002 309(1): 99-107.
6. Golombek DA, Ferreyra GA, Agostino PV, Murad AD, Rubio MF, Pizzio GA, Katz ME, Marpegan L, Bekinschtein TA. From light to genes: moving the hands of the circadian clock. *Front Biosci*. 2003 8:s285-93.
7. Green CB. Molecular control of *Xenopus* retinal circadian rhythms. *J Neuroendocrinol*. 2003 15(4):350-4.
8. Gwinner E, Brandstatter R. Complex bird clocks. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001 356(1415): 1801-10.
9. Johnson CH, Elliott JA, Foster R. Entrainment of circadian programs. *Chronobiol Int*. 2003 20(5): 741-74.
10. Kennaway DJ. Resetting the suprachiasmatic nucleus clock. *Front Biosci*. 2004 9:56-62.
11. King DP, Takahashi JS. Forward genetic approaches to circadian clocks in mice. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1996 61:295-302.
12. Kornhauser JM, Ginty DD, Greenberg ME, Mayo KE, Takahashi JS. Light entrainment and activation of signal transduction pathways in the SCN. *Prog Brain Res*. 1996;111:133-46.
13. Lowrey PL, Takahashi JS. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004 5:407-41.
14. Meijer JH, Schwartz WJ. In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms*. 2003 18(3): 235-49.
15. Menaker M, Moreira LF, Tosini G. Evolution of circadian organization in vertebrates. *Braz J Med Biol Res*. 1997 30(3):305-13.
16. Pittendrigh CS. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol*. 1993 55:16-54.
17. Ralph MR, Lehman MN. Transplantation: a new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker. *Trends Neurosci*. 1991 14(8):362-6.
18. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002 418(6901):935-41.
19. Smale L, Lee T, Nunez AA. Mammalian diurnality: some facts and gaps. *J Biol Rhythms*. 2003 18(5): 356-66.
20. Weaver DR. The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *J Biol Rhythms*. 1998 13(2):100-12.

10.3. Páginas web

Laboratorio de los autores: <http://cronos.unq.edu.ar>

Center for Biological Timing: www.cbt.virginia.edu/

Society for Research on Biological Rhythms: www.srbr.org/

Journal of Biological Rhythms: <http://jbr.sagepub.com/>

Chronobiology International: www.dekker.com/servlet/product/productid/CBI

11. Cuestiones de revisión

11.1. ¿Cómo comprobarías que una estructura del organismo es un oscilador circadiano? ¿Cuáles son las pruebas de que los núcleos supraquiasmáticos contienen un reloj circadiano en mamíferos?

11.2. Diseña un experimento de lesión y trasplante para comprobar que una estructura determinada es un reloj biológico responsable de i) la fase, ii) el período y iii) la amplitud de un ritmo circadiano específico.

11.3. ¿Cuáles serían las ventajas adaptativas de poseer un sistema circadiano? ¿Cómo se puede demostrar esto experimentalmente, tanto en laboratorio como en campo?

11.4. ¿Qué tipo de mutantes son útiles para el estudio del sistema circadiano? ¿Qué mutante desearías diseñar para comprobar alguna propiedad de este sistema? ¿Qué experimentos harías con él?

11.5. ¿A qué se llama "el eje circadiano"? ¿Qué ejemplos hay en distintos grupos de vertebrados? ¿Qué experimentos comprueban el funcionamiento de los componentes de este eje, y del sistema en su conjunto?

Relato de un descubrimiento. Ritmos circadianos en Antártida: un modelo para comprender la necesidad de contar con un sistema circadiano aun cuando el mundo no resulta en dador de hora infalible (Diego Golombek).

Como cronobiólogo principiante me maravillaba la precisión de los ritmos circadianos en condiciones de laboratorio, aún en las condiciones más constantes que se puedan imaginar. Pero me inquietaba la pregunta de la necesidad de estos ritmos endógenos en un mundo que es tan fiable cuando debe indicarnos qué hora (o incluso, qué época del año) es. ¿Para qué mantener un reloj autónomo cuando el comportamiento y la fisiología pueden responder rápida y directamente a la presencia o ausencia de luz, a las mareas o a la temperatura?

Una de las maneras de responder esta pregunta es encontrar situaciones en las que el mundo no sea tan fidedigno como reloj externo. Así, en cuanto se presentó la posibilidad de viajar a Antártida para una campaña de verano, acepté sin dudar para poner a prueba la hipótesis. Una vez descartados los experimentos con invertebrados marinos o con el personal de la base, por diversas razones técnicas, nos centramos en el estudio de una colonia de simpáticos pingüinos de barbijo (*Pygoscelis antarctica*) en época reproductiva, y que debían realizar viajes al mar para buscar alimentos para las crías. A lo largo de varios días de registro ocular en ausencia casi total de variaciones ambientales (luz, temperatura, humedad), pudimos comprobar un fuerte ritmo diario en el comportamiento locomotor de estos individuos, *como si supieran qué hora era*. Por supuesto, cabe la posibilidad de que otra variable ambiental más sutil y que no estuviéramos teniendo en cuenta (como las diferencias en radiación solar) continuara variando en forma periódica y sincronizara dichos ritmos, pero este trabajo de campo bastó para que los jóvenes cronobiólogos regresáramos al laboratorio-hogar con la satisfacción de haber comprobado que, a veces, vale la pena tener un reloj en la cabeza que nos diga qué hora es, cuando nada o nadie es capaz de decirlo con precisión.

Historia del descubrimiento del hámster Tau (Dr. Martin Ralph, Universidad de Toronto, Canadá)

Hay muchas razones por las cuales el hámster dorado ha resultado indispensable para el estudio de los ritmos circadianos. Las más notables son la exactitud y precisión de sus ritmos de actividad locomotora. El comienzo de la actividad nocturna en una rueda de locomoción puede ser predicho con una certeza de unos pocos minutos para cada día o ciclo circadiano. Los investigadores confían en estas características a tal punto que los datos de aquellos individuos que no se desempeñan de acuerdo con lo esperado son usualmente descartados o retirados de los experimentos.

El primer mutante *tau* fue descubierto en 1985 por un estudiante (Martin Ralph) trabajando en el laboratorio del Dr. Michael Menaker en la Universidad de Oregon (EE.UU.). El patrón anormal de sincronización a un ciclo luz-oscuridad de 24 horas y la inestabilidad de los horarios de comienzo de actividad locomotora nocturna lo hacían inútil para el propósito del experimento que se estaba llevando a cabo, y este animal estuvo a punto de ser descartado y reemplazado. Sin embargo, una pequeña regularidad en el patrón relativamente impredecible (los comienzos tempranos de actividad ocurrían siempre a la misma hora del día) sugerían que esta anomalía podía ser significativa. El animal fue entonces estudiado en condiciones de oscuridad constante, junto con el resto del grupo... y lo demás es historia. El período del ritmo circadiano de este hámster resultó ser de 22 horas, algo nunca visto con anterioridad. Unos pocos cruzamientos experimentales demostraron que la mutación era semidominante, y que el animal original era heterocigota para el alelo mutante. Todos los heterocigotas tenían períodos cercanos a 22 horas, mientras que el de los mutantes homocigotas resultó ser cercano a las 20 horas (Ralph et al., 1988).

El descubrimiento de la mutación contribuyó decisivamente para que los investigadores buscaran otras mutación del reloj circadiano en mamíferos, pero no fue sino hasta 2000 que el gen *tau* fue identificado como caseína kinasa1-e (Lowrey et al., 2000). El destino del mutante *tau* original (macho) es desconocido. Poco después de producir tres camadas, este hámster fue robado del bioterio de Oregon y nunca más fue visto nuevamente. No obstante, animales con la mutación han sido mantenidos desde entonces y continúan siendo valiosos para la investigación. Los mutantes *tau* han sido utilizados en estudios de trasplantes neurales para demostrar la importancia del núcleo supraquiasmático en la generación de los ritmos (Ralph et al., 1990). El patrón anormal de sincronización ha sido asociado a problemas de salud y una mortalidad temprana. Finalmente, estudios recientes de pacientes con síndrome de avance de fase del sueño han identificado mecanismos moleculares relacionados y un fenotipo similar en humanos al del fenotipo *tau* de los hámsters.