

# La cadencia del reloj biológico

*Los organismos se ajustan, en su mayoría, a ritmos cronométricos de 24 horas. La genética nos ha revelado parentescos entre los relojes moleculares de la mosca del vinagre, el ratón y el hombre*

Michael W. Young



SAN FRANCISCO



**H**ay que hacer un auténtico esfuerzo para no quedarse dormido a las siete de la tarde. El apetito sentido a las quince desaparece a la hora de la cena. Nos despertamos a las cuatro de la madrugada, sin posibilidad de seguir dormidos. Son situaciones que conocen muy bien quienes viajan de Nueva York a San Francisco. En general, con motivo de unas vacaciones de una semana o por traslados de negocios, cuando el organismo se ha acostumbrado ya al nuevo horario es el momento de volver a casa y retomar la rutina.

En mi laboratorio, un grupo de moscas *Drosophila* viaja también de Nueva York a San Francisco, o al revés, aunque en vuelo simulado. En vez de terminales de aeropuerto hay sendas incubadoras, del tamaño de un frigorífico, donde se lee, en una, “Nueva York” y, en la otra, “San Francisco”. Las luces de las incubadoras se encienden y se apagan en el momento en que sale o se pone el sol en esas ciudades. (Por razones de coherencia, hemos puesto el orto a las seis de la mañana y el ocaso a las seis de la tarde, en ambas urbes.) Y hemos fijado la temperatura de las incubadoras en 22°C.

Las moscas emprenden su viaje simulado en el interior de pequeños tubos de vidrio, ajustados dentro de bandejas que controlan sus movimientos con un haz de luz infrarroja. Cada vez que una mosca atraviesa el haz, proyecta una sombra en un fototransmisor, conectado a su vez a un ordenador que registra la actividad. El ir de Nueva York a San Francisco no implica ningún vuelo real de cinco horas para los insectos. Nos limitamos a desconectar la bandeja de una incubadora, la trasladamos a la otra y conectamos.

Nos servimos del argot transcontinental para identificar y estudiar las funciones de varios genes que parecen ser los engranajes del reloj biológico que controla los ciclos de día y noche en una gama amplia de organismos. Incluimos en éstos la mosca del vinagre, el ratón y el hombre. La identificación de tales genes nos permite determinar las proteínas que cifran, proteínas que podrían convertirse en diana del tratamiento de diversas afecciones, desde trastornos del sueño hasta depresiones estacionales.

El engranaje fundamental del reloj biológico se halla en el núcleo supraquiasmático (NSQ), un grupo de células nerviosas del hipotálamo. Cuando la luz estimula al amanecer la retina del ojo, ciertos nervios especializados envían señales al núcleo supraquiasmático,



NUEVA  
YORK

**1. EL SOMETIMIENTO** de moscas del vinagre a un salto simulado de horario ayuda a entender las bases moleculares de los relojes biológicos de los organismos, incluido el hombre. Las moscas se mantienen en tubos de vidrio pequeños (*fotografía a la izquierda*) dispuestos en bandejas equipadas con sensores que registran la actividad de los insectos. (En la fotografía, Michael

W. Young nos muestra una de éstas repleta de tubos.) Cuando una bandeja de una incubadora con la hora de Nueva York, donde es de noche a la 7:30 de la tarde, se traslada a otra incubadora que simula la hora de San Francisco, donde son las 4:30 y hay luz todavía, se registra una caída en picado de los niveles de proteínas clave del cerebro de los insectos.

# EL RELOJ BIOLÓGICO

## CUESTIONES BASICAS

**¿Dónde reside el reloj biológico?** En los mamíferos el reloj principal que dicta la actividad del ciclo de día y noche, el ritmo circadiano, se halla en el núcleo supraquiasmático del cerebro. Pero hay células por todo el organismo que también presentan este tipo de actividad rítmica.

**¿Qué es lo que dirige el reloj?** En el interior de las células del núcleo supraquiasmático, hay genes rítmicos especializados que se activan o inactivan por las propias proteínas que determinan, en un bucle de realimentación que tiene una cadencia de 24 horas.

**Por lo que concierne al reloj biológico del ciclo normal de 24 horas, ¿depende de la luz y la oscuridad?** No. Los ritmos moleculares de la actividad de estos genes cronometradores son innatos y automantenidos. Persisten en ausencia de ciclos ambientales de día y noche.

**¿Qué papel desempeña la luz en la regulación y reajuste del reloj biológico?** La luz brillante que absorbe la retina durante el día ayuda a sincronizar los ritmos de actividad de los genes cronometradores con el ciclo am-

biental vigente. La exposición a una luz brillante durante la noche reajusta los ritmos circadianos cambiando rápidamente la cantidad de algunos productos de los genes vinculados con la función de reloj.

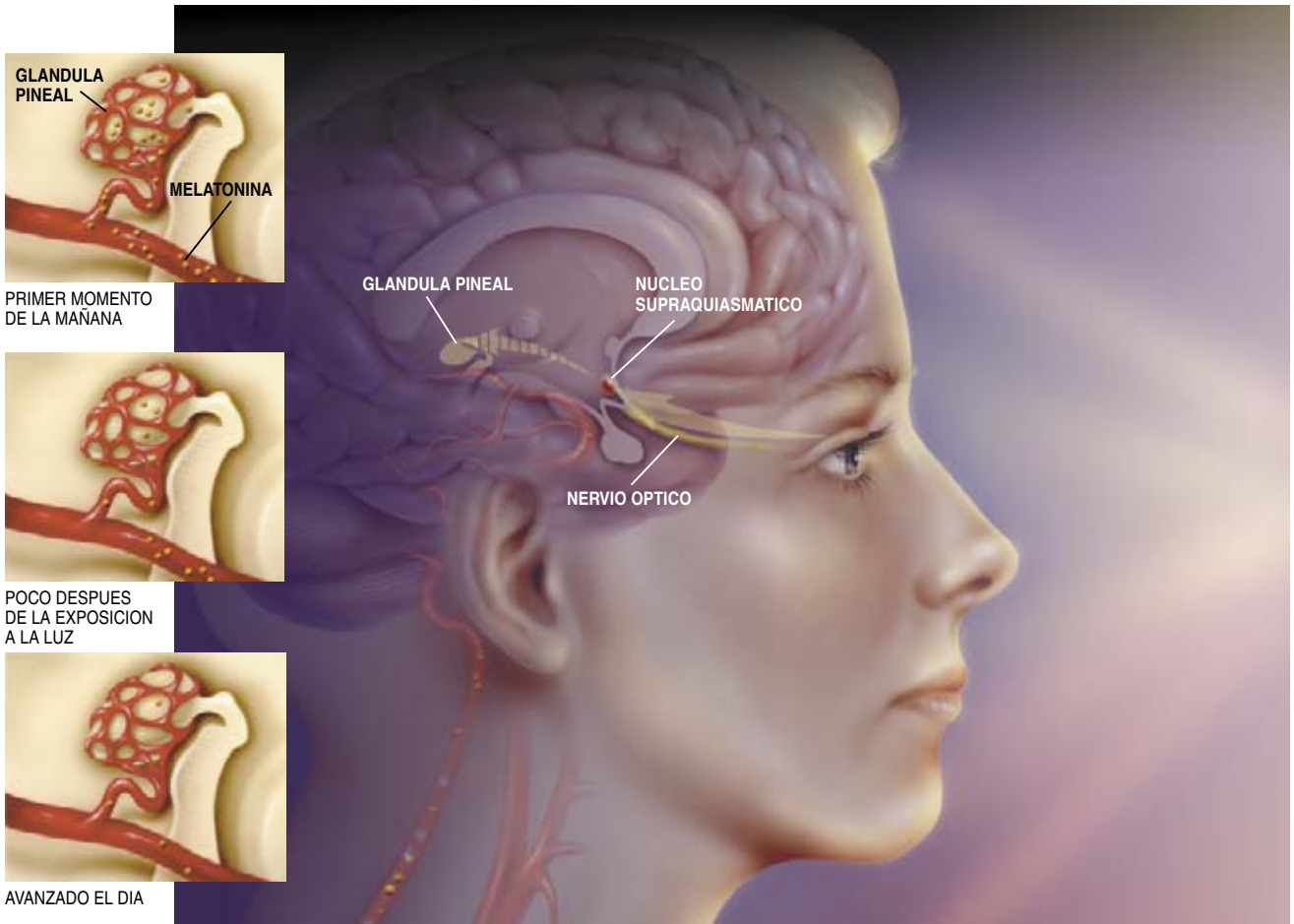
**¿Cómo regula un reloj molecular la actividad día-noche de un individuo?** Las proteínas fluctuantes sintetizadas por los genes cronometradores controlan vías genéticas adicionales que sincronizan el reloj molecular con cambios pautados de la fisiología y comportamiento.

que a su vez controla el ciclo de producción de numerosas sustancias dotadas de actividad biológica. El NSQ estimula la glándula pineal, una región cerebral vecina. Según las instrucciones del NSQ, esta glándula produce con determinada cadencia melatonina, la hormona del sueño.

Con el avance del día, hasta el atardecer, la glándula pineal incrementa de forma gradual la síntesis de melatonina. Al subir los niveles sanguíneos de la hormona, se asiste a un descenso ligero de la temperatura corporal y a un aumento de la tendencia al sueño.

### El reloj humano

La luz, así parece, pone en hora cada día el reloj biológico. No obstante, el ritmo circadiano, el cambio de día y noche, sigue funcionando incluso en ausencia de luz, prueba de que la actividad del NSQ es innata.



2. LA LUZ que incide en el ojo frena la síntesis de melatonina en la glándula pineal. Según parece, esa hormona (*recuadros*) interviene en la inducción del sueño. La señal para reducir

la secreción de melatonina se transmite desde la retina, vía nervio óptico, al núcleo supraquiasmático (NSQ). La conexión del NSQ con la glándula pineal es indirecta.



MICHAEL W. YOUNG dirige el laboratorio de genética de la Universidad de Rockefeller. Preside también la unidad Rockefeller de la Fundación Nacional de la Ciencia y el Centro de Ajuste y Coordinación Temporal Biológico, un consorcio investigador formado por las universidades de Brandeis, Northwestern, Rockefeller y Virginia y el Instituto Scripps de Investigación en la Jolla.

A comienzos de los años sesenta, el grupo de Jürgen Aschoff, del Instituto Max Planck de Fisiología del Comportamiento en Seewiesen, demostró que los voluntarios encerrados en un *bunker* experimental —sin luz natural, relojes ni otras pistas acerca del tiempo— mantenían un ciclo casi

normal de sueño y vigilia de unas 25 horas.

Más recientemente, los grupos encabezados por Charles Czeisler y Richard E. Kronauer, de la Universidad de Harvard, han determinado que el ritmo circadiano humano es de 24,18 horas. Investigaron el comportamiento de 24 hombres y mujeres (11 de ellos tenían veintitantos años y 13 tenían sesenta años o algo más) que vivieron durante más de tres semanas en un recinto sin más clave horaria que un ciclo débil de luz y oscuridad artificialmente ajustado a 28 horas y que daba a estos individuos la señal para dormir.

Midieron la temperatura corporal de los participantes, que en condiciones normales desciende por la noche, así como la concentración sanguínea de melatonina y de cortisol, una hormona

del estrés que mengua su concentración al atardecer. Observaron que, aun cuando se les había prolongado el día en cuatro horas, la temperatura corporal y los niveles de melatonina y cortisol seguían funcionando de acuerdo con su propio reloj circadiano interno de 24 horas. Además, no parecía que la edad influyera en la cadencia del reloj. Aunque los resultados obtenidos en estudios anteriores sugerían que la edad alteraba los ritmos circadiano, en la investigación de Harvard las fluctuaciones hormonales y de temperatura corporal de los individuos de más edad seguían siendo tan regulares como las del grupo de sujetos más jóvenes.

Por muy fructíferos que fueran los estudios del *bunker*, hubo que recurrir a las moscas del vinagre para investigar los genes responsables del reloj biológico. Las moscas son ideales para los estudios genéticos gracias a su vida corta y tamaño manejable, factores que posibilitan realizar cultivos e intercambiar miles de ellos en el laboratorio hasta que empiecen a aparecer en número creciente las mutaciones de interés. Para acelerar el proceso de mutación, se exponen los insectos a agentes químicos inductores de la misma.

A principios de los setenta Ron Konopka y Seymour Benzer, del Instituto de Tecnología de California, daban cuenta de las primeras moscas mutantes que presentaban ritmos circadianos alterados. Les administraron un agente mutágeno; registraron, luego, el movimiento de 2000 individuos de la progenie, sirviéndose en parte de un aparato similar al que empleamos ahora nosotros en los vuelos simulados. La mayoría de las moscas tenían un ritmo circadiano normal: persistían activas unas 12 horas del día, para descansar las doce siguientes. Pero en tres de las moscas había mutaciones que alteraron esa pauta. Una seguía un ciclo de 19 horas, otra un ciclo de 28 horas y la tercera carecía de ritmo circadiano, descansando y entrando en actividad de forma errática.

En 1986 mi grupo de trabajo de la Universidad de Rockefeller y el que dirige Jeffrey Hall en la Universidad de Brandeis, y Michael Rosbash en el Instituto Howard Hughes, también en Brandeis, hallaron que las tres moscas mutantes mostraban tres alteraciones diferentes en el gen *period*, o *per*; un gen que habíamos aislado, cada grupo por separado, dos años antes. Ante el fenómeno de que mutaciones diferentes en un mismo gen causarían tres comportamientos, pensamos

## RELOJES POR TODAS PARTES NO ESTAN SOLO EN EL CEREBRO

En su mayor parte, la investigación sobre los relojes biológicos se ha centrado en el cerebro. Pero no es éste el único órgano que observa un ritmo de día y noche.

Jadwiga Giebultowicz, de la Universidad estatal de Oregón, ha identificado proteínas PER y TIM —componentes clave de los relojes biológicos— en los túbulos malpighianos de la mosca del vinagre, semejantes a los que vemos en el riñón. También ha observado que las proteínas se sintetizan según un ciclo circadiano; aumentan de noche y decrecen de día. El ciclo se mantiene incluso en moscas decapitadas, lo que demuestra que las células malpighianas no responden sólo a señales procedentes del cerebro del insecto.

El grupo de investigación de Steve Kay, del Instituto Scripps de Investigación en La Jolla, ha obtenido, además, pruebas de la existencia de relojes biológicos en las alas, patas, partes bucales y antenas de la mosca del vinagre. Al transferir genes que regulan la síntesis de proteínas PER fluorescentes a moscas vivas, el grupo de Kay ha puesto de manifiesto que cada tejido lleva un reloj fotorreceptor, independiente. Los relojes siguen funcionando y responden a la luz cuando se extraen los tejidos del insecto para su análisis.



EN LA CABEZA de la mosca del vinagre hay varios relojes biológicos. Las células extraídas de las partes bucales y antenas reflejan la misma respuesta ante ciclos de luz y oscuridad que otras células pertenecientes al cerebro.

Los relojes biológicos extracraneales no son algo privativo de las moscas del vinagre. Ueli Schibler, de la Universidad de Ginebra, demostró en 1998 que operan también según un ciclo circadiano los genes *per* de fibroblastos de rata, células del tejido conjuntivo.

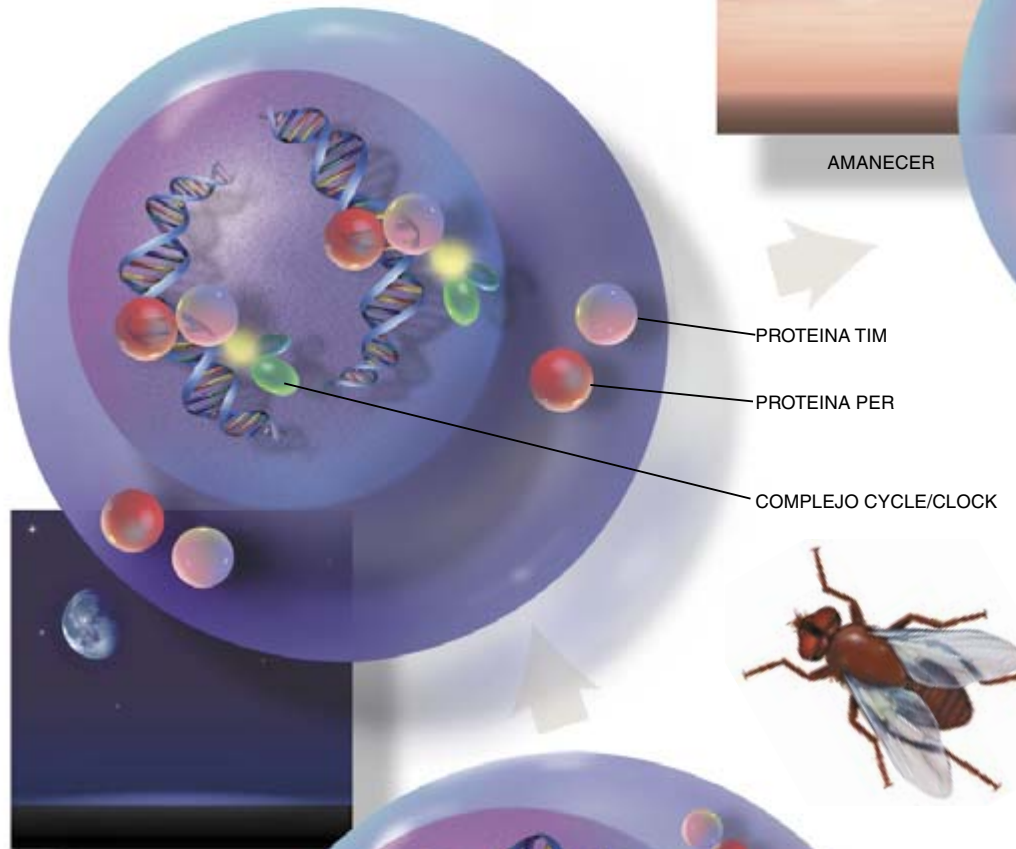
Ante la diversidad de tipos celulares que presentan actividad de reloj circadiano, cabe inferir que, en muchos tejidos, la sincronización reviste interés suficiente para garantizar su seguimiento local. Estos hallazgos podrían aportar un significado nuevo a la expresión “reloj biológico”.

—M.W.Y.

# UN DIA EN EL RELOJ BIOLÓGICO DE UNA MOSCA EN SUS CELULAS CEREBRALES HALLAMOS RELOJES MOLECULARES EMPARENTADOS CON LOS DEL HOMBRE

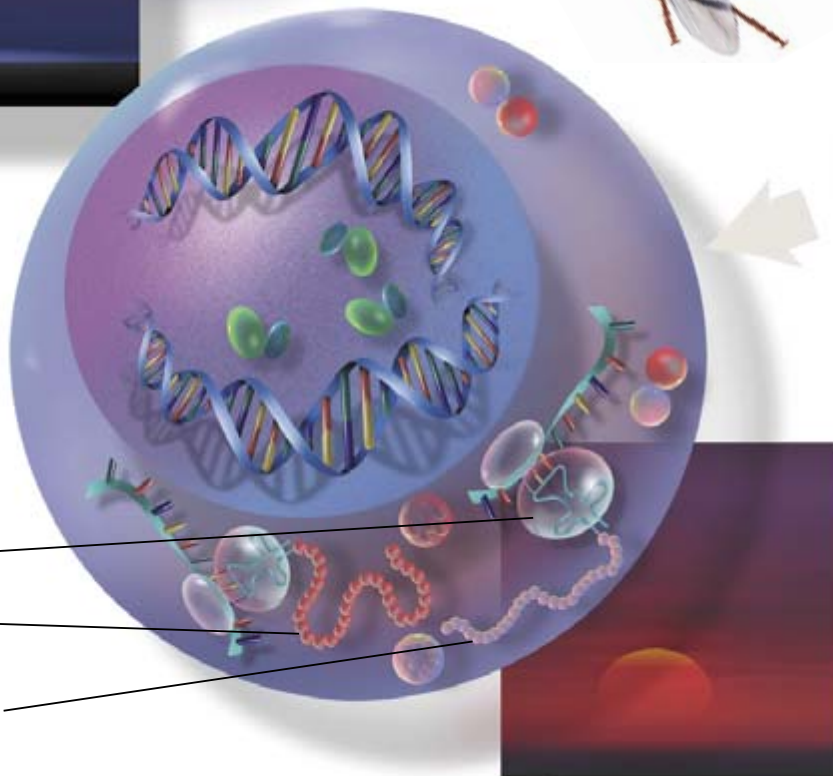
**4** Durante la noche, los nuevos complejos PER/TIM se dirigen al núcleo; aquí bloquean la actividad de CYCLE y CLOCK, silenciando su producción. Cuando amanece al día siguiente, los complejos PER/TIM se degradan. Vuelve a reanudarse el ciclo.

MEDIANOCHE

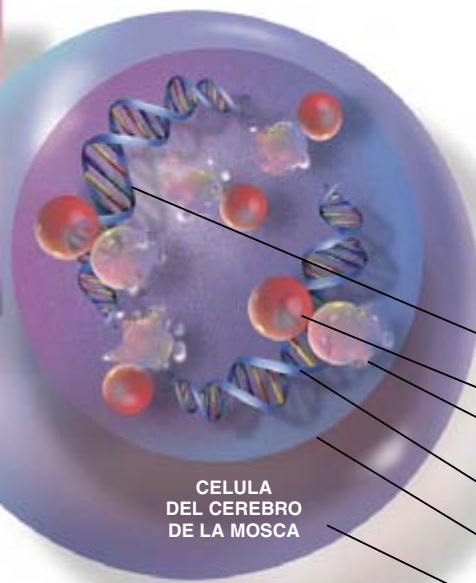


**3** Una vez en el citoplasma, los ARN mensajeros de *per* y *tim* se adosan a los ribosomas. Estos orgánulos empiezan a "leer", es decir, a traducir la información de los ARN mensajeros para crear las cadenas correspondientes de aminoácidos. Tales cadenas se pliegan luego en proteínas PER y TIM ya maduras que se unen entre sí y producen los complejos PER/TIM al anochecer.

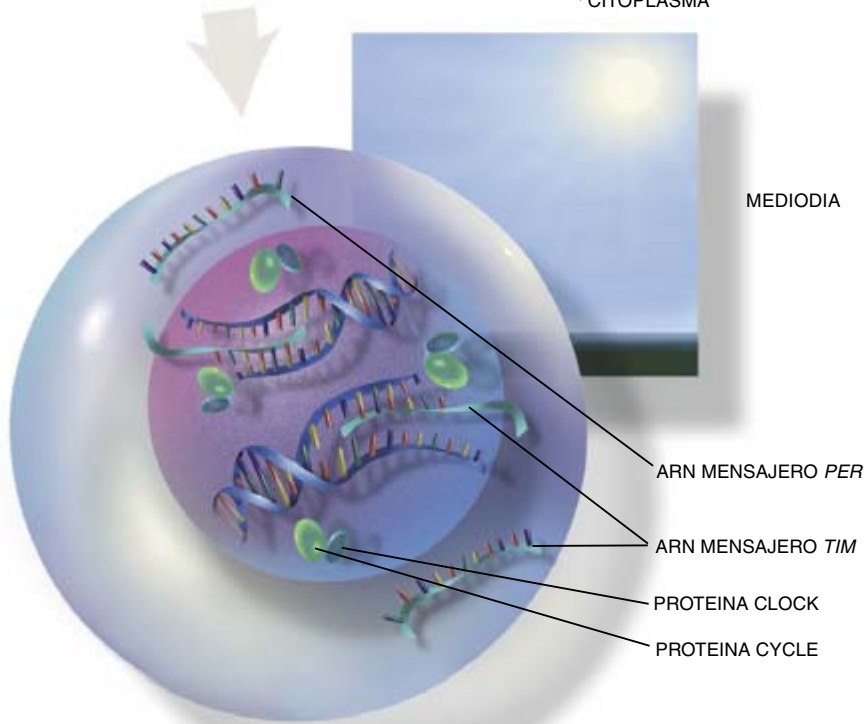
RIBOSOMA  
PROTEINA PER  
RECIENTE  
TRADUCIDA  
PROTEINA TIM  
RECIENTE  
TRADUCIDA



ANOCHECER



**1** Si exponemos a la luz una mosca, comienzan a degradarse los complejos moleculares constituidos por proteínas PER y TIM en las células del cerebro. Los complejos PER/TIM forman parte de un bucle de realimentación que controla la actividad de *per* y *tim*, genes que contienen las instrucciones para fabricar las proteínas PER y TIM.



**2** Hacia mediodía, se han degradado ya todas las proteínas PER y TIM. Otras dos, las proteínas CYCLE y CLOCK, se adhieren entre sí y forman complejos que se unen a los genes *per* y *tim* para activarlos. Cuando estos genes entran en funcionamiento, se transcriben en ARN mensajeros, intermediarios genéticos que pasan al citoplasma.

que *per* se hallaba involucrado en la producción del ritmo circadiano y en la fijación de la cadencia de ese ritmo.

Aislado el gen, cabía preguntarse si controlaba en solitario el ciclo de día y noche. Para averiguarlo, Amita Sehgal y Jeffrey Price, becarios de mi laboratorio, examinaron más de 7000 moscas; buscaron si había más mutantes con el ritmo alterado. Por fin dieron con una mosca que, al igual que una de las mutantes *per*, carecía de ritmo circadiano manifiesto. La nueva mutante presentaba interesado el cromosoma 2, mientras que el *per* pertenecía al cromosoma X. Supimos entonces que teníamos un gen nuevo; lo llamamos *timeless*, o *tim*.

¿Qué relación guardaba el nuevo gen con *per*? Los genes constan de ADN, que porta las instrucciones de la síntesis de proteínas. El ADN nunca abandona el núcleo de la célula; sus órdenes moleculares se leen ARNm mediante, que sí sale del núcleo y penetra en el citoplasma, donde se fabrican las proteínas. Con los genes *tim* y *per* acometimos la síntesis *in vitro* de las proteínas PER y TIM. En colaboración con Charles Weitz, de la Facultad de Medicina de Harvard, observamos que, si mezclábamos las dos proteínas, éstas se adherían entre sí; podrían, pues, interactuar en el interior de la célula.

Tras una cohorte de experimentos, comprobamos que la producción de las proteínas PER y TIM implicaba un bucle de realimentación de tipo reloj. Los genes *per* y *tim* permanecían activos hasta que las concentraciones de sus proteínas respectivas alcanzaban un nivel de concentración suficiente para que éstas se juntaran. Formaban entonces complejos que penetraban en el núcleo y bloqueaban los genes correspondientes. Pasadas unas horas, las enzimas degradaban los complejos, los genes tornaban a activarse y se iteraba de nuevo el ciclo.

### El movimiento de las manecillas del reloj

Una vez que hubimos encontrado dos genes que operaban concertados para crear un reloj molecular, nos planteamos conocer de qué modo arrancaba y se ponía en hora. Después de todo, nuestros ciclos de sueño y vigilia se adaptan muy bien a los viajes entre distintos husos horarios, aunque el reajuste quizá requiera un par de días o una semana.



## CAMBIOS EN EL ORGANISMO EN EL PERIODO DE 24 HORAS

1:00 A.M.

- Es la hora más probable de que las embarazadas alumbren.
- Alcanzan su apogeo los linfocitos T coadyuvantes, células del sistema inmunitario.

2:00 A.M.

- Ascenden a su cota máxima los niveles de hormona del crecimiento.

4:00 A.M.

- Es el momento proclive para los ataques de asma.

6:00 A.M.

- Momento más probable del inicio de la menstruación.
- Los niveles sanguíneos de insulina están en su mínimo.
- Comienza la subida de la presión sanguínea y se aviva el ritmo cardíaco
- Aumentan los niveles de cortisol, una hormona del estrés.
- Empiezan a descender los niveles de melatonina.

7:00 A.M.

- El peor momento de los síntomas de la fiebre del heno

8:00 A.M.

- Riesgo máximo de un ataque al corazón o un derrame cerebral.
- El peor momento para la artritis reumatoide.
- Los linfocitos T coadyuvantes están en su nivel más bajo del día.

Mediodía

- Alcanza su máximo el nivel de hemoglobina en sangre.

3:00 P.M.

- Apogeo de la fuerza prensil, el ritmo respiratorio y la sensibilidad de los reflejos.

4:00 P.M.

- Punto máximo de la temperatura corporal, ritmo cardíaco y presión sanguínea.

6:00 P.M.

- El flujo urinario está en su máximo.

9:00 P.M.

- El umbral del dolor es mínimo

11:00 P.M.

- Probabilidad máxima de la respuesta alérgica.

Eso sucede cuando comenzamos a trasladar las bandejas de moscas de "Nueva York" a "San Francisco". Entre las primeras cosas que observamos fue que, si pasábamos una mosca de una incubadora oscura a otra brillantemente iluminada para imitar la luz del día, las proteínas TIM desaparecían del cerebro de la mosca en cuestión de minutos.

Y lo que revestía mayor interés: la dirección en que "viajaban" las moscas afectaba a los niveles de sus proteínas TIM. Si sacábamos a las moscas de "Nueva York" a las 8 de la tarde, cuando ya había oscurecido, y las colocábamos en "San Francisco", donde todavía había luz a las 5 de la tarde, los niveles de TIM se hundían. Pero una hora más tarde, cuando las luces se apagaban en "San Francisco", la proteína TIM empezaba a acumularse de nuevo. Era evidente que, con la transferencia, los relojes moleculares de las moscas se paraban al principio, para reanudar, tras una demora, la cadencia de acuerdo con el nuevo huso horario.

Por contra, las moscas trasladadas a las 4 de la mañana desde "San Francisco" experimentaban una prematura salida del sol en "Nueva York", donde eran las 7 de la mañana. Este viaje provocaba también la caída de los niveles de TIM, pero ahora la proteína no comenzaba a acumularse porque se había adelantado el reloj molecular con el cambio de huso horario.

El examen de la evolución de la síntesis del ARN correspondiente al gen *tim* nos enseñó nuevas cosas sobre el mecanismo subyacente bajo las diferentes respuestas moleculares. Los niveles de este ácido nucleico son más altos a las 8 de la tarde y más bajos entre las 6 y las 8 de la mañana. Una mosca trasladada a las 8 de la tarde de "Nueva York" a "San Francisco" produce niveles máximos de ARN de *tim*; por eso, la proteína perdida por la exposición a la luz en "San Francisco" se reemplaza fácilmente tras el ocaso en su nuevo destino. Pero la mosca que viaja a las 4 de la mañana de "San Francisco" a "Nueva York", fabricaría muy poco ARN de *tim* antes de la partida. Lo que la mosca experimenta como una temprana salida del sol provoca la eliminación de TIM y permite que el ciclo siguiente de producción empiece con un horario adelantado.

## REGISTRO DE LOS RITMOS CIRCADIANOS DE LAS MOSCAS MONTAJE EXPERIMENTAL PARA SEGUIR LA ACTIVIDAD VOLADORA DE LA MOSCA

Para descubrir qué genes intervenían en el ciclo de actividad noche-día de las moscas del vinagre, se las expuso a substancias inductoras de mutaciones génicas, que se reflejarían en su progenie. Cuando los descendientes llegan a la madurez, se les encierra en tubos de vidrio. Los tubos, individuales, tienen en un extremo el alimento para las moscas y, en el otro, un algodón que permite el paso del aire.

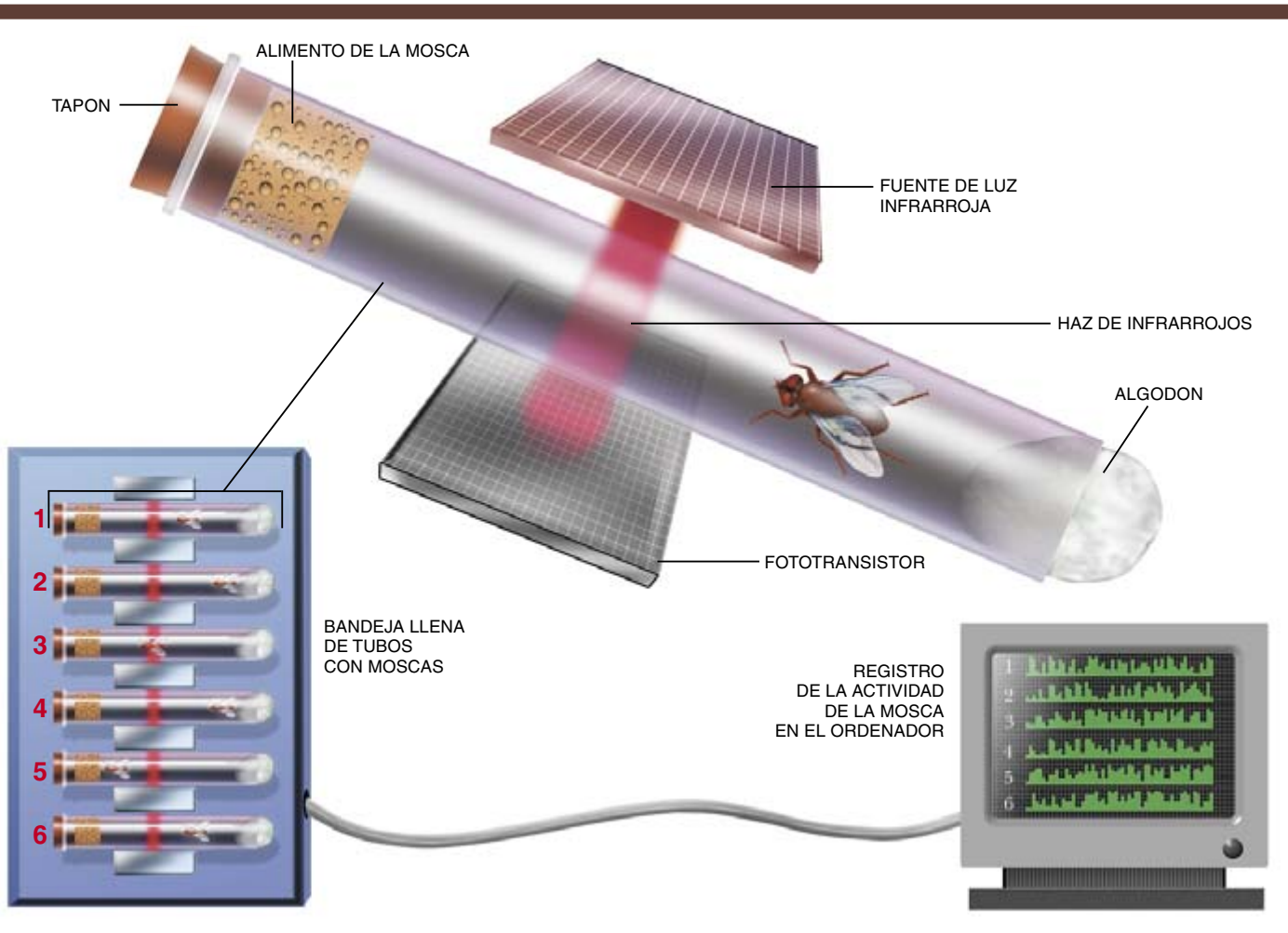
Se colocan los tubos en bandejas especiales, equipadas con luces de rayos infrarrojos y detectores. La mosca del vinagre, por norma, descansa durante la noche y está activa durante el día. Las bandejas, conectadas a un ordenador, registran cada movimiento de la mosca al señalar cuántas veces atraviesa un haz de rayos infrarrojos. El análisis de miles de moscas mutantes con este sistema nos descubre que algunas presentan anomalías en los ritmos circadianos.

—M.W.Y.

### No sólo los insectos

El estudio de estos saltos horarios en las moscas nos ha ayudado a entender los ritmos circadianos de los mamíferos, hombre incluido. En 1997, Cheng Chi Lee, de la Facultad de Medicina de Baylor, por un lado, y, por otro, el grupo encabezado por Hajime Tei, de la Universidad de Tokio, e Hitoshi Okamura, de la Universidad de Kobe, aislaron en el ratón y en el hombre equivalentes del gen *per*. La investigación subsiguiente, que contó con la implicación de numerosos laboratorios, condujo al aislamiento en 1998 de genes *tim* humanos y de ratón. Los genes demostraron su actividad en el núcleo supraquiasmático.

Los estudios con ratones contribuyeron también a la solución de una cuestión clave. ¿Qué es lo que insta, en primera instancia, la actividad de los genes *per* y *tim*? En 1997 el grupo de Joseph Takahashi, del Instituto Howard Hughes de la Universidad Northwestern, aisló el gen



*Clock*, así lo llamaron, cuya versión mutada producía ratones sin un ritmo circadiano definido. El gen cifra un factor de transcripción, una proteína que en este caso se unía al ADN y permitía que se leyera transcrito en ARN mensajero.

No tardó en aislarse, en la mosca, una versión del gen *Clock* del ratón. Varios equipos empezaron a introducir combinaciones de genes *per*, *tim* y *Clock* en células de mamíferos y de moscas del vinagre. Tales experimentos revelaron que la proteína CLOCK tenía por diana el gen *per* en el ratón; y los genes *per* y *tim*, en la mosca. El sistema cerraba un círculo completo: en las moscas, cuyos relojes son los mejor conocidos, la proteína CLOCK —en combinación con la proteína codificada por el gen *cycle*— se une a los genes *per* y *tim* para activarlos, pero sólo si no están presentes en el núcleo las proteínas PER y TIM. Los cuatro genes con sus proteínas constituyen el corazón del reloj biológico en las moscas. Con algunas modificaciones forman el mecanismo responsable de

los ritmos circadianos en el reino animal, de los peces a las ranas, de los ratones al hombre.

El grupo de Steve Reppert, en Harvard, y Justin Blau, en mi laboratorio, acaban de abordar las señales específicas que sincronizan los relojes biológicos con los momentos de diversas conductas, con las fluctuaciones hormonales y con otras funciones. Todo indica que algunos genes de interés se ponen en marcha mediante la interacción directa con la proteína CLOCK. Por su parte, PER y TIM atenazan la capacidad de CLOCK de activar dichos genes, al propio tiempo que producen las oscilaciones del bucle central de realimentación, instaurando pautas generales de actividad génica cíclica.

Se nos avecina un futuro en el que se obtendrá, en la mosca del vinagre y el ratón, un sistema entero de genes regulados por su reloj biológico. Con toda verosimilitud, se descubrirán, en el seno de esas redes, productos sin caracterizar todavía que ejercen efectos llamativos sobre el comportamiento. Tal vez uno

de esos productos, si no un componente del propio reloj molecular, sea un blanco idóneo para los fármacos que alivien los trastornos provocados por los cambios horarios, los efectos secundarios de los turnos de trabajo, las alteraciones del sueño y las depresiones que les acompañan.

#### BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

THE MOLECULAR CONTROL OF CIRCADIAN BEHAVIORAL RHYTHMS AND THEIR ENTRAINMENT IN *DROSOPHILA*. Michael W. Young en *Annual Review of Biochemistry*, vol. 67, págs. 135-152; 1998.

MOLECULAR BASIS FOR CIRCADIAN CLOCKS. Jay C. Dunlap en *Cell*, vol. 96, n.º 2, págs. 271-290; 22 de enero de 1999.

TIME, LOVE, MEMORY: A GREAT BIOLOGIST AND HIS QUEST FOR THE ORIGINS OF BEHAVIOR. J. Weiner. Alfred Knopf, 1999.