

Capítulo 2.

LOS RITMOS CIRCADIANOS

Bettina Tassino, Ana Silva

¹Sección Etología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

²Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

Desde su origen, la vida en el planeta ha estado sometida a los predecibles e inexorables cambios cíclicos en el ambiente producto de los movimientos de la Tierra alrededor del Sol y sobre su propio eje. Esta estructuración temporal del ambiente es responsable de la segregación en el tiempo de diversas actividades y procesos de los seres vivos, con sus implicancias evolutivas y ecológicas. Por ejemplo, los ciclos anuales, marcados por cambios de temperatura y fotoperíodo, son responsables de la estacionalidad reproductiva, las migraciones y la hibernación. Por otro lado, la rotación del planeta sobre su eje con un período de 24 h provoca la alternancia entre una fase oscura y una fase luminosa que genera el día y la noche. A su vez, la vida de la mayoría de los animales se reparte en dos grandes fases: una de actividad, en la que se alimentan, exploran o buscan pareja, y otra de reposo. En función de cuándo los animales ubiquen la fase de actividad serán diurnos o nocturnos. En este reparto temporal de actividades, son determinantes la competencia y la depredación, factores ecológicos poderosos que afectan las estrategias temporales de los organismos.

Este escenario de cambios cíclicos entre el día y la noche ha condicionado la vida desde su origen y la ha enfrentado al enorme desafío de ajustar la maquinaria biológica a esa temporalidad. La emergencia de ritmos diarios o *circadianos* constituye una forma de afrontar este reto para los organismos vivos, en la medida en que permiten anticipar los cambios predecibles y aseguran la coordinación de diversos procesos fisiológicos y respuestas comportamentales. La presencia generalizada de estos ritmos controlados por un reloj interno en plantas, hongos, animales invertebrados y vertebrados, inclusive en cianobacterias, indica que esta solución se originó muy temprano en la historia de la vida en el planeta y se conservó a lo largo de miles de millones de años como una ventaja adaptativa, consecuencia del proceso

evolutivo de selección natural. Que estos ritmos ocurran y se mantengan depende de la expresión de un grupo de genes reloj cuya transcripción rítmica en un bucle de retroalimentación negativa, controla la actividad circadiana en todos los seres vivos. Aunque los genes involucrados varían entre los diferentes grupos taxonómicos, los mecanismos de acción y la relación entre los componentes del sistema son muy similares. Si bien estos ritmos persisten aún en condiciones constantes de luz o de oscuridad, la sucesión del día y la noche es la principal clave ambiental que sincroniza el reloj interno con las condiciones del ambiente.

En particular en los mamíferos, incluidos los seres humanos, el sistema circadiano está altamente jerarquizado y es comandado por un marcapasos central ubicado en el cerebro, en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo, encargado de marcar el ritmo y coordinar todas las funciones del organismo. Este controlador maestro, a través de una conexión nerviosa, recibe desde la retina la estimulación lumínica captada por receptores que contienen melanopsina, una proteína especialmente sensible a la luz azul. A su vez, los NSQ se conectan a través de un circuito bien conocido con la glándula pineal, ubicada también en el cerebro, responsable de la producción de la hormona melatonina. Durante el día, la luz activa a los NSQ, lo que provoca la inhibición de la glándula pineal y en consecuencia los niveles de melatonina son muy bajos. Por el contrario, durante la noche, la ausencia de luz desencadena la producción de melatonina, también llamada “hormona de la noche”. De esta manera, luego del atardecer los niveles circulantes de melatonina aumentan gradualmente hasta llegar a un pico máximo alrededor de las 3 AM, momento a partir del cual desciende, por lo que el despertar, en general, coincide con una vuelta a los niveles mínimos de melatonina. Esta hormona, entonces, se constituye en la mensajera química del tiempo para el organismo.

Cuando un descubrimiento se transforma en hito

En 2017 fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina o Fisiología los investigadores norteamericanos Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash y Michael W. Young, quienes trabajando con la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) en 1984 aislaron el gen *period* (*per*) y avanzaron en el conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a sus ritmos circadianos.

Si bien en su momento este hallazgo fue muy significativo por avanzar en el conocimiento del vínculo entre genes y comportamiento, concretamente entre

el gen *per* y el ritmo de actividad/reposo de las moscas, la real dimensión del descubrimiento sobrevino con el correr de los años, cuando otras investigaciones revelaron la presencia de genes reloj en otros seres vivos. Esto demostró que las bases genéticas y la maquinaria molecular responsables de los ritmos circadianos son casi universales, están altamente conservadas a lo largo de la historia evolutiva y persisten en el árbol de la vida como una solución ventajosa que permite a los organismos anticiparse a los cambios cíclicos y previsibles.

Las investigaciones genéticas de principios del siglo XX iniciadas por Thomas Hunt Morgan ubicaron a la mosca de la fruta como el modelo biológico por excelencia para indagar en las bases de la herencia. Inscripto en esa tradición, en 1971 en su laboratorio del California Institute of Technology, Seymour Benzer y su estudiante Ron Konopka identificaron mediante estudios conductuales, mutantes con ritmos circadianos distorsionados que respondían al gen *period* (*per*) ubicado en el cromosoma X. El nombre se debe a que las moscas portadoras de diferentes alelos de este gen exhibían ciclos de actividad y reposo de diferentes períodos: mientras la mayoría exhibe un ciclo próximo a las 24 h, en algunas el ciclo era de 19 h (período corto, *per^S*), en otras de 28 h (período largo, *per^L*) y algunas eran totalmente arrítmicas (*per⁰*) como se muestra en la Figura 1. Así estos investigadores identificaron por primera vez el gen responsable de un comportamiento complejo, el primero de los genes involucrados en los ritmos circadianos y por lo tanto en el cronometraje del tiempo. El año de ese gran descubrimiento Jeffrey C. Hall inició su estancia posdoctoral en el laboratorio de Benzer enfocado en los vínculos entre genes y comportamiento. En 1974, se estableció con una posición estable en Brandeis University donde, dedicado a investigar la genética del comportamiento sexual y reproductivo en las moscas descubrió que la llamada que realizan los machos durante el cortejo para atraer a las hembras presentaba un patrón rítmico. Enseguida se preguntó cómo se comportarían los mutantes del gen *per* ¿cambiarían las llamadas las moscas que tenían alterados los genes vinculados al cronometraje del tiempo? Así fue como le pidió a Konopka que le enviara algunos ejemplares para investigar las llamadas de cortejo en moscas portadoras de los diferentes alelos de ese gen. Con el material que recibió, uno de los estudiantes de Hall, Charalambos P. Kyriacou se dedicó a grabar y analizar las llamadas de cortejo de los machos portadores de cada uno de los alelos de ese gen temporizador: los machos de cada variante exhibieron una cadencia de llamada que variaba en el mismo sentido que su ciclo de actividad/reposo. Los machos con un patrón azaroso de actividad y reposo mostraban una llamada arrítmica (*per⁰*), mientras las llamadas de los machos con un período largo en el ciclo de actividad/reposo se presentaban con un

ritmo más lento (*per^L*). Sumado a esto, los cruzamientos entre dos especies hermanas con diferente patrón rítmico de llamada, *D. melanogaster* y *D. simulans* le permitieron a Hall y Kyriacou identificar que este gen responsable de medir el tiempo estaba ubicado en el cromosoma X, uno de los cromosomas sexuales. Hall comentó sus hallazgos con su amigo y compañero de basquetbol Michael Rosbash dedicado a la biología molecular, una disciplina en los albores de una revolución que marcaría el desarrollo de la ciencia hasta el día de hoy. La combinación de las preguntas y la experiencia en genética de *Drosophila* de Hall (que además también tenía los mutantes) con el entusiasmo y las nuevas herramientas moleculares que manejaba Rosbash era un buen augurio.

(Figura 1. Ritmos de actividad locomotora)

A inicios de la década de 1980, mediante la entonces innovadora técnica de clonación, se hizo posible aislar una porción de ADN de una célula e insertarla a su vez en el ADN de otra, utilizando enzimas de restricción capaces de “cortar” la cadena de ADN en sitios específicos. En este escenario y haciendo uso de las novedosas herramientas, Rosbash tenía por delante el enorme desafío de diseccionar el gen *per* y arrojar luz por primera vez sobre los mecanismos moleculares detrás de los ritmos biológicos. Hall y Rosbash después de muchas conversaciones, diseñaron un elegante experimento: en huevos de moscas mutantes portadoras la variante arrítmica del gen reloj (*per⁰*) insertar el gen *per* no mutante, aquel capaz de establecer ciclos de actividad/reposo próximos a las 24 h. Aunque hoy en día estas técnicas, y otras mucho más sofisticadas, son de uso corriente en cualquier laboratorio en que se utilicen herramientas moleculares y no nos sorprenden los avances de la ingeniería genética, en 1984 esto sonaba a ciencia ficción. En primer lugar, lograron aislar el gen *per*. En segundo lugar, luego de muchos intentos inyectando el gen *per* en su variante “normal”, obtuvieron moscas adultas que mantenían la actividad y el reposo en ciclos de 24 horas: habían logrado por primera vez cambiar el comportamiento de un ser vivo mediante la inserción de un gen. En tercer lugar, descubrieron que la proteína codificada por el gen *per* se acumulaba durante la noche y se degradaba durante el día y se aventuraron a hipotetizar que la proteína PER podría inhibir directamente la transcripción del gen *per*, en un mecanismo de retroalimentación negativa que podría explicar la modulación continua y rítmica de sus niveles (Figura 2). En paralelo y conociendo la línea de trabajo de Hall y Rosbash, Michael Young

en la Rockefeller University perseguía el mismo objetivo: clonar el gen *per* y probar su implicancia como gen reloj en los ritmos circadianos. En diciembre de 1984 se publicaron los resultados de ambos grupos de investigación, mientras Hall y Rosbash con Konopka y Kyriacou como coautores publicaron en la revista *Cell*, el trabajo de Young y sus colaboradores apareció en la revista *Nature*.

(Figura 2. Mecanismo de retroalimentación en la regulación de la expresión del gene *per*.)

Descubrir que era posible restituir un comportamiento “normal” como la capacidad de cronometrar el tiempo mediante la inserción de un gen con esa propiedad, generó una gran conmoción en el ambiente científico, y las preguntas acerca de la posibilidad de trasladar genes de una especie a otra y en consecuencia modificar los patrones de comportamiento no tardaron en llegar. Hall y Rosbash estuvieron dispuestos a emprender esa aventura. Clonaron el gen *per* de *D. simulans*, lo insertaron en el genoma de embriones de la especie hermana *D. melanogaster* y obtuvieron machos de esta especie, pero que emitían las llamadas de cortejo correspondientes a la otra especie. La inserción del gen *per* no solamente restauraba un comportamiento complejo previamente ausente, sino que además atravesaba la barrera entre las especies modificando las llamadas de cortejo que las identifican.

El reloj circadiano humano en el mundo real

En la década de 1960, antes aún de que se conocieran las bases genéticas y los mecanismos moleculares del reloj biológico, una serie de experimentos realizados por los investigadores alemanes Jürgen Aschoff y Rütger Wever revelaron el carácter endógeno de los ritmos circadianos en seres humanos. En condiciones de iluminación constante y de total aislamiento respecto al exterior, los ritmos de temperatura y el ciclo sueño-vigilia de las personas que permanecieron por más de 30 días en estos “bunkers” se producían en ciclos de aproximadamente 24 horas, con diferencias entre los individuos. Diferentes combinaciones de los genes reloj en cada individuo influyen en las preferencias circadianas o cronotipos en un continuo que va desde las personas que se despiertan temprano y eligen agendar sus actividades en la mañana (preferencias matutinas o “alondras”), hasta quienes se mantienen activos en la noche y consideran ese su mejor momento para trabajar o estudiar (preferencias vespertinas o “búhos”). La mayoría de la población exhibe preferencias intermedias entre estos dos extremos y en general los varones son más trasnochadores que las mujeres. Por otro lado, se conoce también que

estas preferencias sufren cambios a lo largo de la vida, y que la adolescencia constituye la etapa de mayor nocturnidad..

Dos referentes actuales de la Cronobiología Humana, los Profesores Till Roenneberg (Alemania) y Charles Czeisler (EEUU) llaman la atención de la presión social y ambiental a las que se ve sometido el reloj biológico en la vida moderna. Señalan dos aspectos fundamentales en los que las condiciones ancestrales en que ha evolucionado el reloj se ven desafiadas en su funcionamiento cotidiano: por un lado, la desincronización social del reloj, que surge del divorcio entre el patrón espontáneo de actividad (que en general se expresa en los días libres) y las demandas que impone la agenda laboral o de estudio; y por otro lado los cambios en la exposición a la luz, la principal clave que sincroniza el reloj. En este sentido, la luz artificial ha provocado una modificación radical disminuyendo el contraste lumínico entre el día y la noche al someternos a una menor exposición durante el día y mayor exposición durante la noche con respecto a nuestros antepasados.

Un ejemplo emblemático para entender la distorsión de la sincronización del reloj biológico lo ofrecen los viajes transmeridionales, que provocan el síndrome denominado *jet-lag* por el desfase transitorio entre la hora que marca el reloj interno y el externo. Sin embargo, no es necesario viajar para desacoplar al reloj biológico de las claves ambientales y sociales. El trabajo nocturno, por ejemplo, impone una desincronización crónica al sistema circadiano con demostrado efecto negativo sobre la salud física y mental de los trabajadores. La desincronización permanente del reloj biológico se conoce como *jet-lag* social y se observa muy especialmente en jóvenes cuya vespertinidad se enfrenta con una educación que se agenda tradicionalmente en horarios matutinos, y que fuerza a un prematuro despertar en los días de semana. Investigaciones realizadas en estudiantes de educación secundaria en nuestro país, que asisten en diferentes turnos, confirman que la desincronización es un factor que impacta negativamente sobre el rendimiento escolar especialmente a los estudiantes vespertinos que asisten al turno matutino.

Por otro lado, en la vida urbana moderna se ha perdido el efecto sincronizador de la luz, debido a la atenuación del contraste de iluminación entre el día y la noche. Vivimos en un escenario lumínico homogéneo, ni tan iluminado durante el día como el reloj biológico lo espera ni tan oscuro durante la noche. Al no poderse fiar de la luz para su sincronización, el reloj funciona en una configuración parecida al curso libre, lo que ha provocado una tendencia global a la nocturnidad y la expresión de una amplia diversidad de preferencias

circadianas. Al mismo tiempo, y aunque parezca contradictorio, el reloj mantiene su sensibilidad a la luz y cada vez tenemos más evidencias de su rol temporizador en nuestra vida real. Desde hace más de 20 años, a partir de experimentos en animales y humanos en condiciones altamente controladas, sabemos que la exposición a la luz blanca intensa durante la mañana adelanta la fase del reloj medida por el momento en que comienza el aumento nocturno de melatonina, mientras que la misma exposición en el atardecer o comienzos de la noche atrasa la fase del reloj. Hoy sabemos que alrededor del atardecer, una luz de baja intensidad también puede atrasar la fase del reloj, que el efecto es más eficiente cuando se utiliza luz enriquecida en azul, que el efecto ocurre aunque el tiempo de exposición sea de pocos minutos, y que hay diferencias individuales en la sensibilidad circadiana a la luz. Por otro lado, experimentos que trasladan personas desde su entorno cotidiano con iluminación eléctrica a un entorno con luz exclusivamente natural, demostraron que se modifica el patrón de secreción de melatonina con solo pasar una semana expuestos a luz natural sin contacto con luz artificial ni pantallas. Estudios realizados en Uruguay con jóvenes universitarios que viajan al verano antártico en momentos en que el día dura más de 20 horas, han mostrado recientemente que la forma en que la fase circadiana se modifica frente al aumento de la exposición a la luz antártica depende de las preferencias circadianas. En la Antártida, los participantes más matutinos atrasan el aumento nocturno de melatonina, así como el inicio del sueño, por presentar una mayor sensibilidad a la exposición a la luz en el entorno del atardecer. En cambio, los participantes más vespertinos adelantan el aumento nocturno de melatonina por presentar una mayor sensibilidad a la luz durante la mañana, aunque sin afectar la ubicación del inicio del sueño en la Antártida

Para terminar...

En este capítulo, presentamos la historia de un hito de la ciencia y los ejes fundamentales sobre los que giran el debate y la investigación actual en Cronobiología Humana. Algunas reflexiones que atraviesan diferentes dimensiones se desprenden de esta historia, en la que se revela que la temporalidad de muy diversas funciones se sustenta en las mismas bases materiales en todos los seres vivos habitantes de este planeta: un conjunto de genes reloj cuyos mecanismos de transcripción-traducción cíclica permiten cronometrar el tiempo y de esa manera anticipar los cambios predecibles en el ambiente.

Desde el punto de vista evolutivo, la similitud entre las moléculas marcapasos y la ubicuidad de estos mecanismos hacen pensar en que el reloj biológico es una cualidad de origen sumamente antiguo y altamente conservada. Independientemente de si los marcapasos celulares derivan de un único ancestro o se originaron en múltiples eventos, la universalidad de este rasgo revela el enorme valor adaptativo de la optimización temporal en todos los seres vivos. Por otro lado, permite comprender que, también en los seres humanos, algunos comportamientos complejos poseen bases biológicas ancestrales, en este caso modeladas por los ciclos de luz y oscuridad a los que está sometida la vida desde su origen. En la década de 1980 la cronobiología aportó por primera vez la evidencia para comprender un comportamiento a partir de la expresión de los genes, lo que permitió a su vez explorar el anclaje molecular de un amplio espectro de conductas en otros animales, desde la construcción de un nido, los despliegues de cortejo o el aprendizaje.

Hoy en día, la comunidad cronobiológica alerta sobre las presiones de la vida moderna a las que está sometido el reloj ancestral, producto principalmente de la generalización de la luz artificial y de unas demandas sociales inéditas. Las consecuencias del desfase entre el reloj interno y el tiempo externo impactan en diversos aspectos de la vida de las personas. El conjunto de recomendaciones elaboradas por reconocidos investigadores convocados por la *Society for the Research on Biological Rhythms* ejemplifica las implicancias sociales del emergente conocimiento cronobiológico acerca de la importancia de la exposición a la luz para el sistema circadiano, los horarios escolares, los horarios de las comidas y la cronomedicina¹.

En una de sus exposiciones luego de ganar el Premio Nobel, Michael Rosbash reflexionaba acerca del valor del reconocimiento y de sus implicancias. Para Rosbash, este premio, además de hacer pública la relevancia del estudio de los ritmos biológicos y sus múltiples contribuciones, contribuyó a subrayar la importancia de los organismos modelo de experimentación, en este caso las moscas de la fruta, que por más alejados que los sintamos de los seres humanos siguen aportando a la ciencia y a la resolución de problemas complejos. Su reflexión final es aplicable a cualquier área de la ciencia en cualquier país del mundo: la única ruta para alcanzar aplicaciones o terapias es la ciencia básica, no hay atajos.

¹ <https://srbr.org/advocacy/public-outreach-briefs/>

LECTURAS RECOMENDADAS

The Nobel Prize In Physiology or Medicine 2017. The Nobel Prize. The Nobel Assembly in Karolinska Institute.
www.nobelprize.org/prizes/medicine/2017/

Tassino B, Migliaro A, Estevan I, Silva A. 2018. El reloj biológico frente a los desafíos de la modernidad. Revista de Innovación en Enseñanza de las Ciencias, 2, 113-126.

Young MW. 2000. La cadencia del reloj biológico. Investigación y Ciencia, Número 284.

