

06 DE ABRIL DE 2001

## Ratones quimeras ofrecen pistas sobre cómo funciona el reloj cerebral

Al estudiar ratones cuyos cerebros contienen un grupo de diferentes neuronas que producen ritmos circadianos normales y ritmos más largos de lo normal, unos investigadores están comenzando a entender cómo las neuronas sincronizan su comportamiento oscilatorio para controlar el reloj interno de 24 horas del cuerpo.

Los experimentos son el comienzo de una nueva vía de investigación, dicen los científicos, que va más allá de descubrir los genes que producen la maquinaria del reloj interno, al explorar cómo las células del cerebro interactúan para producir ritmos circadianos coherentes.

Los científicos también dicen que la técnica de producir un grupo de diferentes ratones genéticos, o "quimeras", ofrece una forma prometedora de estudiar cómo las células trabajan conjuntamente en las diversas regiones del cerebro para generar comportamientos específicos.

La mayoría de los relojes biológicos funcionan con un ciclo de 24 horas, o ciclo circadiano (del latín, "cerca de un día"), que gobierna funciones tales como el dormir y el despertar, el descanso y la actividad, la regulación del balance de líquidos, de la temperatura corporal, del rendimiento cardíaco, del consumo de oxígeno y de la secreción de las glándulas endocrinas. En mamíferos, los componentes principales del reloj circadiano se encuentran en las células en el núcleo supraquiasmático (SCN, por sus siglas en inglés) del cerebro. Dentro de estas células, los componentes moleculares del reloj son "reacomodados" diariamente por los efectos de la luz y otros estímulos.

En un artículo publicado en el número del 6 de abril de 2001, de la revista *Cell*, el investigador del Instituto Médico Howard Hughes, Joseph S. Takahashi y Sharon Low-Zeddies, ambos en la Universidad Northwestern, informaron que crearon más de 200 ratones quimeras distintos, cuyos núcleos supraquiasmáticos tenían diferentes proporciones de neuronas circadianas normales y mutantes.

Los ratones fueron diseñados genéticamente utilizando una técnica estándar para producir ratones quimeras. Los investigadores combinaron embriones de ocho células de ratones de tipo salvaje con células de embriones que contenían un gen *Reloj* mutante, lo que lleva a la pérdida de ritmos circadianos y hace que el período tenga una longitud de 27 a 29 horas en

animales homocigotas (ratones con dos copias del gen mutante).

Generalmente, estos embriones agregados forman de manera espontánea un único embrión, que entonces puede ser implantado en un ratón sustituto que parirá un ratón quimera. Dado que los ratones de tipo salvaje eran albinos y los ratones mutantes eran pigmentados, los científicos podían determinar qué animales eran quimeras por el color jaspeado de su pelaje y la pigmentación del ojo. Además, las células *Reloj* mutantes llevaban un marcador genético para una tinción característica, de modo que los científicos podían distinguir las células *Reloj* mutantes de las células de tipo salvaje, al examinar los cerebros de los animales.

Los científicos midieron el comportamiento circadiano de los animales quimeras usando los análisis estándares para medir la cantidad de tiempo que estos pasaban en las ruedas que tenían en sus jaulas. "Uno de los hechos importantes establecidos en investigaciones anteriores con ratas y ratones era que las neuronas individuales del SCN podían generar sus propias oscilaciones circadianas *in vitro*", dijo Takahashi. "Esos experimentos resultaron importantes porque demostraron que el oscilador circadiano en mamíferos es celular-independiente o celular-intrínseco para las neuronas del SCN".

Un segundo aspecto importante que se aprendió de estudios anteriores, dijo Takahashi, fue que la mutación *Reloj* reducía la amplitud y alargaba los ritmos circadianos de neuronas individuales *in vitro*. Finalmente, hizo notar que los investigadores encontraron que ratas y hámsteres a los que se les había lesionado el SCN, perdían el ritmo circadiano. Transplantes de tejidos del SCN restauraban los ritmos circadianos en los animales.

Todos estos experimentos anteriores sugieren que el estudio de los ratones *Reloj* quimeras puede ofrecer un nuevo entendimiento sobre cómo funcionan las células del SCN para generar los ritmos circadianos de los animales, dijo Takahashi. El estudio de los ratones quimeras será considerablemente más ventajoso que el estudio de animales con tejidos trasplantados porque la estructura del SCN permanecerá intacta, dijo.

Low-Zeddies y Takahashi midieron y analizaron la actividad circadiana de los ratones quimeras, cuyos SCN pasaban de tener mayoría de células *Reloj* mutantes a tener mayoría de células de tipo salvaje. Sus estudios demostraron que, de acuerdo al comportamiento, cerca de un tercio de los ratones quimeras parecían ser animales normales de tipo salvaje, un tercio parecía ser mutante homocigota y el tercio restante intermedio.

"Esto sugirió que para dominar el comportamiento de los animales, el SCN tenía que tener mayoría de un tipo de célula", dijo Takahashi. "Eso podría parecer obvio, pero resultó que no era predecible porque los experimentos de lesiones demostraban que si apenas se tenía algunas células restantes en el SCN, esas eran suficientes para generar los ritmos", dijo. "Sin embargo, encontramos claramente que el SCN necesita mayoría de un tipo de célula para dominar el comportamiento".

Según Takahashi, sin embargo, uno de los resultados más interesantes fue que algunos de los ratones quimera intermedios se comportaban como animales mutados genéticamente que eran heterocigotas-esto quiere decir que cada una de sus células tenía un gen *Relej* mutante y un gen de tipo salvaje-. Los animales quimera intermedios y los mutantes heterocigotas presentaron ritmos circadianos intermedios de 25 horas.

"Este resultado demuestra enfáticamente que las interacciones entre células y la integración de estos períodos deben estar ocurriendo en estos ratones", dijo Takahashi. "Y dado que los períodos en tales quimeras son coherentes y estables, la única forma de conseguir esto es que todas las células estén sincronizadas".

Análisis comparativos de los animales quimeras realizados por Low-Zeddies y Takahashi revelaron que el período de oscilación circadiana y la amplitud de la actividad del animal no siempre varía relacionadamente. En cambio, en animales mutantes *Relej*, la extensión del período circadiano va siempre acompañada de una disminución en la amplitud de la actividad del animal mutante.

"No creemos que alguien haya encontrado que el período y la amplitud puedan variar independientemente", dijo Takahashi. "Tales hallazgos son tan complejos y delicados que no habrían sido posibles sin la utilización de un número y variedad de animales tan grandes".

Estudios adicionales serán necesarios para entender los detalles sobre cómo las neuronas del SCN coordinan el ritmo circadiano, dijo Takahashi. Sin embargo, dijo, esta nueva estrategia será una vía importante que se utilizará para entender la organización fisiológica de los ritmos circadianos.

"Durante los últimos cuatro años, el campo ha estado inmerso en el descubrimiento de genes y en la descripción del mecanismo molecular del reloj circadiano en mamíferos, moscas y otros organismos", dijo. "Por supuesto, los genes son importantes, pero para entender el comportamiento animal, tenemos que entender cómo interactúan las células en el cerebro para producir un comportamiento circadiano coherente". Finalmente, Takahashi enfatizó que los experimentos con quimeras demuestran tener una nueva función en estudios con tales animales.

"El análisis de quimeras se ha aplicado tradicionalmente a problemas de desarrollo en la biología del ratón", dijo. "Pero este estudio demuestra que también puede ser aplicado al estudio de cómo la estructura cerebral gobierna el comportamiento, lo que tradicionalmente se había pensado era un mecanismo demasiado complejo para ser estudiado de esta forma".