

# Recorriendo el camino de la investigación con el tiempo como compañero de viaje

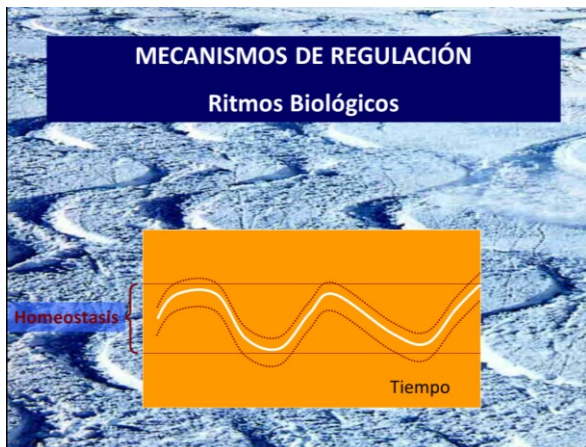
Beatriz Baño Otálora

Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Reino Unido

Beatriz.BanoOtalora@manchester.ac.uk

## INTRODUCCIÓN

Empecé a estudiar la carrera de Biología en la Universidad de Murcia con la idea de dedicarme a la docencia una vez que acabase. En mi mente no se había cruzado el mundo de la Ciencia aún. De hecho, ser investigadora me parecía algo bastante alejado e inaccesible. Fue durante el tercer año de licenciatura cuando una asignatura cambió el futuro que hasta entonces tenía en mente. Fisiología Animal fue la encargada de despertar mi interés por la investigación. Recuerdo cuando el profesor Juan Antonio Madrid, quien más tarde fue mi director de Tesis junto con la Dra. Ángeles Rol, nos habló del concepto de homeostasis como pilar básico de la fisiología. Sin embargo, también añadió, que esta homeostasis había que entenderla como una estabilidad sujeta a cambios periódicos o recurrentes a lo largo de tiempo.



**Figura 1.** Concepto de homeostasis en el contexto de los ritmos biológicos. Diapositiva utilizada por el profesor Juan Antonio Madrid durante la clase de Fisiología Animal del curso académico 2003-2004 y que me inspiró a dedicarme al campo de la Cronobiología.

Y así fue como descubrí la existencia de los ritmos biológicos. Es increíble como aquella gráfica (Figura 1) marcó mi rumbo profesional hacia un nuevo mundo gobernado por el factor tiempo, el mundo de la Cronobiología. Se trata de una ciencia joven, que si bien en los últimos años ha experimentado un gran impacto en la sociedad, aún es una

gran desconocida dentro del círculo académico. Sin embargo, tan pronto uno escucha hablar de Cronobiología, y de la existencia de los ritmos biológicos, se da cuenta de que esos ritmos están presentes allá donde se mire.

Decidí entonces entrar como alumna interna en el Departamento de Fisiología y conocer más de cerca aquella ciencia totalmente desconocida para mí. Durante los tres años que estuve de alumna interna tuve claro que quería dedicarme a la investigación y que, hiciera lo que hiciera, el concepto tiempo y el cómo “las cosas” varían a lo largo del día, y se repiten día tras día, siempre viajarían conmigo. Ese viaje me llevó a desarrollar la Tesis Doctoral en el departamento de Fisiología, gracias a una beca FPU del Ministerio de Educación y Ciencia, y después a mudarme como investigadora posdoctoral, gracias a la Fundación Séneca, a la *Faculty of Life Sciences* de la Universidad de Manchester, ciudad que alberga una de las comunidades científicas más importantes de Europa en el campo de los ritmos biológicos y la Cronobiología (Figura 2).



**Figura 2.** *Understanding the rhythm of life*. Fotografía de la fachada de uno de los edificios de la *Faculty of Life Sciences* de la *University of Manchester* en la que se resalta la importancia de la gran comunidad científica en el campo de los ritmos biológicos que hay en esta facultad.

Así, el doctorado me descubrió el mundo de la Cronobiología y me dio alas, mientras que la etapa posdoctoral me está permitiendo volar y crecer, desarrollar nuevas ideas y darme cuenta de que la ciencia, al igual que la mente, no tiene límites.

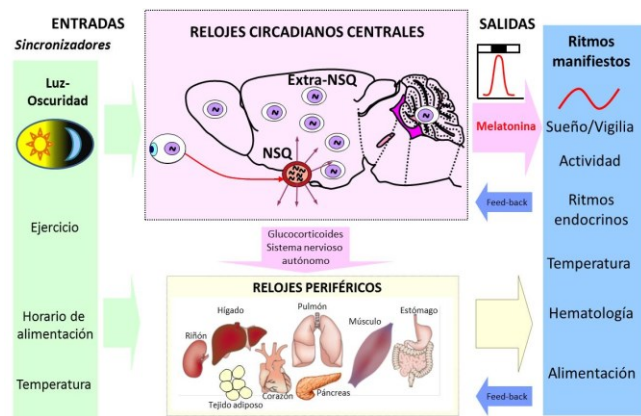
### ¿QUÉ SON LOS RELOJES BIOLÓGICOS?

Si le preguntamos a una persona por qué lleva reloj, lo más probable es que nos responda que le es útil para saber qué hora es y no llegar tarde a sus citas. Dicho de otra manera, el reloj le sirve para anticipar sus actividades y estar en el lugar apropiado en el momento adecuado para sus intereses. Millones de años antes de la invención de los relojes artificiales, los seres vivos comenzaron a desarrollar mecanismos capaces de medir el paso del tiempo, fundamentalmente a escala diaria, mareal, lunar y anual. Pero, ¿para qué le sirve a un animal disponer de relojes? Desde el punto de vista evolutivo debemos tener en cuenta que cualquier forma de vida en la tierra ha estado sometida, directa o indirectamente, a cambios cíclicos ambientales de diferente periodo. De hecho, desde la aparición de la vida, la tierra ha girado sobre su eje aproximadamente unas  $13 \times 10^{11}$  veces llevando consigo cambios diarios de exposición al sol (alternancia del ciclo luz/oscuridad) y las consiguientes variaciones de temperatura, disponibilidad de alimento, etc. La existencia de relojes biológicos en los organismos supone una ventaja adaptativa ya que les permite anticiparse a estos cambios periódicos y por lo tanto previsibles del ambiente. Así, es muy importante poder anticiparse a la llegada de las estaciones, programar la reproducción para que las crías nazcan en el momento con mayor probabilidad de sobrevivir, llegar a la madriguera antes de que el lobo salga de caza, controlar el ciclo celular para que las células se dividan en los momentos de mínima exposición a la radiación solar ultravioleta y reducir así la probabilidad de que ocurran mutaciones, etc.

Una de las primeras observaciones en el campo de la Cronobiología fue el hecho de que estos ritmos no son el resultado de una respuesta pasiva/reactiva ante un ambiente cíclico, sino que tenían un origen endógeno o interno. Así por ejemplo, el movimiento de apertura y cierre de las hojas de algunas plantas cada 24 horas sigue manteniéndose incluso si las colocamos en una caja en oscuridad durante varios días. Por tanto, los ritmos biológicos en ausencia de señales temporales externas, no desaparecen, sino que persisten.

El sistema o reloj que se encarga en nuestro organismo de generar y coordinar los ritmos de ~24h o ritmos circadianos (del latín *circa-*, cerca de, y *diem-*, día) se conoce como sistema circadiano. La estructura básica de este sistema está integrada por un marcapasos o reloj central que oscila de manera autónoma pero que ha de ponerse en hora cada día sincronizándose a las señales periódicas del ambiente (ej. luz, horarios de alimentación). Es como si este reloj biológico no fuera de cuarzo sino más bien de cuerda, y en el caso de los humanos tendiera a retrasar unos minutos cada día si no es puesto en hora. En mamíferos este marcapasos o reloj central

se ubica en una región del cerebro conocida como núcleo supraquiasmático (NSQ) que en mamíferos cuenta con unas 20.000 neuronas. Una vez que la actividad eléctrica de éstas ha sido sincronizada (puesta en hora), el NSQ comunica la señal temporal de “qué hora es” al resto del cerebro y del organismo. Una de las manecillas del reloj, que informa al organismo sobre la hora, es la hormona melatonina. Esta hormona se produce durante la noche, con independencia de si los organismos son diurnos (cuando su periodo de actividad ocurre durante las horas de luz) o nocturnos (cuando realizan su actividad durante la noche). Esto ha llevado a que en ocasiones se la denomine “la oscuridad química”. Sin embargo, las funciones de esta hormona van más allá de informar al organismo de la llegada de la noche ya que además se ha descrito como un potente agente antioxidante, neuroprotector, oncostático y modulador del sistema inmune. Un hecho de gran importancia es que la producción de melatonina se puede inhibir por la exposición a luz durante la noche.



**Figura 3.** Organización del sistema circadiano. La estructura básica consta de un marcapasos central localizado en el Núcleo Supraquiasmático (NSQ) y una serie de osciladores periféricos, las vías de entrada que ponen en hora el reloj, y las vías de salida que informan al resto del organismo sobre la hora que es. Para más información véase el texto. (Modificado de Garaulet y Madrid, 2009).

La maquinaria molecular que subyace a la generación de los ritmos circadianos se basa en bucles de retroalimentación positivos y negativos, y su funcionamiento se traduce en un perfil de expresión rítmico de distintos genes que se va repitiendo día tras día. Recientemente, se ha descrito que la expresión de estos genes reloj no solo ocurre en el marcapasos central sino que también se expresan en diferentes áreas cerebrales (ej. hipocampo, implicado en los procesos de aprendizaje y memoria) y en múltiples tejidos periféricos (como hígado, pulmón...). Estas regiones, a pesar de ser capaces de oscilar de manera autónoma, reciben información sobre la hora que es desde el marcapasos central. De esta manera, se consigue una sincronización interna de todo el sistema estableciéndose un orden

temporal entre los ritmos circadianos manifiestos. Entre estos ritmos tenemos, por ejemplo, el ritmo de actividad y reposo, el ritmo de temperatura corporal, el ciclo sueño-vigilia, ritmos hormonales, etc. (Figura 3).

### IMPORTANCIA DEL ORDEN TEMPORAL INTERNO

No solamente es importante que la mayoría de las variables sigan ritmos circadianos sino que además, estos ritmos han de estar coordinados entre sí. Podríamos pues pensar en nuestro organismo como una orquesta en la que cada uno de esos ritmos sería un músico y en la que todos ellos han de tocar en el momento correcto, todos ellos han de estar coordinados entre sí, para que suene una maravillosa quinta sinfonía de Beethoven.

Si reflexionamos acerca de la sociedad moderna en la que vivimos, nos daremos cuenta de que se trata de una sociedad de 24h que tiende a la constancia ambiental, en la que el ciclo natural de luz-oscuridad se está viendo alterado por el abuso de la luz artificial durante la noche. En estas sociedades 24h, la contaminación lumínica, los horarios de ocio, el trabajo a turnos, y los viajes transmeridianos generan un desajuste en la organización temporal de los ritmos y relojes biológicos conocido como cronodisrupción (CD), que compromete seriamente la salud y el bienestar del organismo. Si volvemos al símil de la orquesta que estaba tocando esa maravillosa sinfonía de Beethoven, lo que ocurre en situaciones de alteración del orden temporal interno es que cada músico empieza a tocar cuando no le corresponde y esa música se convierte en ruido. Ese ruido que aparece en la armonía de nuestro sistema circadiano es lo que se conoce como CD.

La CD se ha asociado con una mayor incidencia de distintas patologías que se están convirtiendo en un gran problema de salud pública. Entre ellas tenemos: obesidad y síndrome metabólico, déficits cognitivos y afectivos, envejecimiento prematuro, enfermedades cardiovasculares, determinados tipos de cáncer y anomalías reproductivas. La historia se complica si además tenemos en cuenta que la relación entre CD y estas patologías es bidireccional, de manera que el desarrollo de estas patologías puede a su vez alterar el funcionamiento del sistema circadiano.

Para poder prevenir y combatir las distintas patologías asociadas con la CD es necesario que se profundice en el conocimiento de los mecanismos básicos que subyacen el funcionamiento del sistema circadiano y que entendamos cómo distintas situaciones pueden alterar este funcionamiento. Estos objetivos eran y siguen siendo uno de los mayores retos dentro del campo de la Cronobiología.

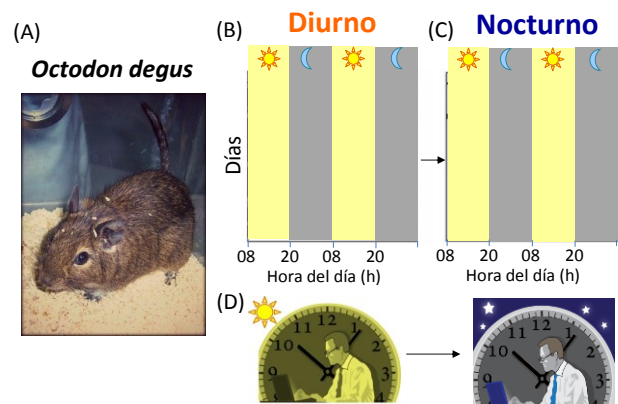
Durante el doctorado y ahora durante mi etapa posdoctoral estoy intentando aportar mi granito de arena a este conocimiento.

### CAMINO HACIA EL DOCTORADO

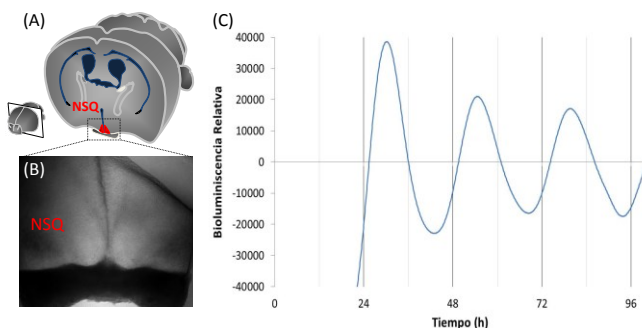
A lo largo de mi etapa predoctoral tuve la suerte de trabajar con distintos modelos animales y diseños experimentales para estudiar las consecuencias y algunos de los mecanismos subyacentes a la CD.

Gran parte de la tesis la llevé a cabo investigando sobre el funcionamiento del sistema circadiano del *Octodon degus*. Este roedor, originario de Chile, constituye un modelo animal muy interesante desde el punto de vista cronobiológico. Sin embargo, pocos laboratorios en el mundo, aparte del grupo de Cronobiología de Murcia, disponen de una colonia de esta especie como modelo animal de investigación.

¿Qué hace al *O. degus* tan interesante? Las especies comúnmente utilizadas en estudios cronobiológicos son modelos animales nocturnos como la rata o el ratón. Sin embargo, el degu, al igual que el ser humano, es principalmente una especie diurna. Así pues, su estudio puede contribuir a una mejor comprensión de cómo funciona el sistema circadiano en los humanos. Curiosamente, el degu además tiene la capacidad de invertir sus patrones de actividad (diurno a nocturno) bajo determinadas condiciones. Esto constituye una oportunidad única para estudiar la posible disrupción del sistema circadiano asociada a estar activo durante la fase normal de descanso (noche) (Figura 4).



Los experimentos realizados durante la Tesis nos permitieron demostrar que el *O. degus* constituye un modelo excelente para estudiar la CD ya que esa capacidad de desplazar su actividad del día a la noche no implica que todos sus ritmos (ej. bioquímicos, hematológicos y de expresión de genes reloj) inviertan en paralelo. Así pues, esta especie muestra una disrupción “espontánea” de su organización temporal interna cuando invierte su fase de actividad constituyendo una oportunidad única para estudiar los problemas de salud asociados a los trabajadores nocturnos. En este mismo sentido, en la Tesis propusimos un nuevo protocolo experimental para generar CD, basado en la simulación de las condiciones de iluminación a las que se ven expuestos los trabajadores con turnos rotatorios. Además del *O. degus*, los otros modelos animales que utilizamos en la Tesis resultaron especialmente útiles para estudiar patologías concretas relacionadas con la CD tales como la degeneración de la retina, la enfermedad de Alzheimer y el cáncer (melanoma). En el caso del desarrollo de melanoma, cabe resaltar que la malignidad del tumor y la disrupción de los ritmos se vieron agravadas por la exposición a luz continua. Estos resultados ponen de manifiesto que los efectos de la contaminación lumínica no solamente pueden ocurrir a nivel ecológico sino también a nivel de la salud y el bienestar del organismo. Finalmente, en la Tesis demostramos que el tratamiento con melatonina (esa hormona que produce nuestro cuerpo cuando llega la noche y que se inhibe por la exposición a luz) contribuye a mejorar los ritmos biológicos en los modelos de cronodisrupción analizados, pero siempre y cuando se administre en el momento apropiado. Los resultados obtenidos representan un avance significativo en el campo de la Cronobiología básica y aplicada y de las Ciencias de la Salud.



**Figura 5.** Ritmo circadiano de expresión de PER2::LUC en el reloj central (Núcleo Supraquiasmático, NSQ). (A) Diagrama del cerebro de ratón indicando la ubicación anatómica del NSQ (Modificado de Belle, 2015, *J Neuroendocrinol*). (B) Microfotografía de un cultivo de NSQ establecido para registrar la expresión del gen reloj *Per2*. (C) La actividad del gen reloj *Per2* se puede monitorizar en cultivos de tejidos obtenidos a partir de ratones transgénicos (PER2::LUC) gracias a la presencia del gen chivato de la luciferasa. Esta gráfica representa la señal de bioluminiscencia registrada de manera continua durante 3 días en un cultivo de NSQ.

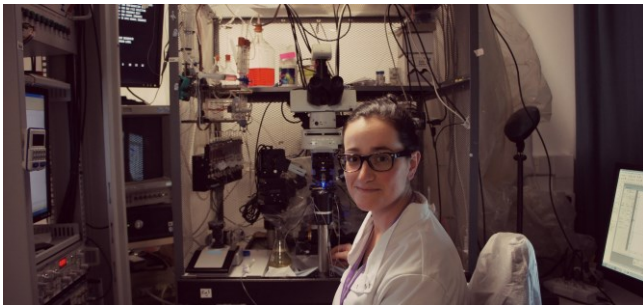
El doctorado, así como las distintas colaboraciones en otros proyectos, me permitieron formarme en el manejo de sistemas de registro de distintos ritmos circadianos, la utilización de programas informáticos especializados para el análisis de series temporales, programas de análisis estadístico, así como técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular. Además a lo largo del desarrollo de la Tesis Doctoral, amplí mi formación con dos estancias en laboratorios extranjeros de gran prestigio internacional en el campo de la Cronobiología, como son el laboratorio del Prof. Hugh Piggins (*Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Reino Unido*) y el de la Prof. Theresa Lee (*Department of Psychology, University of Michigan, Estados Unidos*). Estas estancias fueron muy enriquecedoras a nivel personal y académico ya que me hicieron ver mi trabajo desde distintas perspectivas. En el caso de Estados Unidos supuso una gran experiencia ya que tuve la suerte de trabajar en uno de los mejores grupos de investigación con el *degu* y compartir mi pasión por esta especie animal con otros investigadores. En el caso de Manchester, me permitió conocer de cerca el laboratorio y la investigación que se llevaba a cabo en él, lo que me llevó posteriormente a decidirme por este grupo para seguir mi formación posdoctoral.

La tesis supuso para mí un viaje increíble, lleno de ciencia y de compañerismo, de esfuerzo y de aprendizaje. Y esos recuerdos siempre viajan conmigo en cada paso que doy.

## ETAPA POSDOCTORAL

Las competencias adquiridas a lo largo de la Tesis Doctoral se centraron en el registro y el análisis de ritmos circadianos fisiológicos y de comportamiento animal, mientras que la formación en el estudio de los mecanismos centrales a estos procesos había sido más reducida. Tenía claro pues, que durante mi etapa posdoctoral quería seguir investigando en el campo de los ritmos biológicos, pero enfocando su estudio desde el campo de la neurofisiología y la biología molecular y celular. Empezó en aquel momento el duro trabajo de conseguir financiación para seguir haciendo lo que me gustaba: investigar. El panorama de la investigación en España no era muy alentador, la reducción en la financiación de la I+D+i estaba ya afectando a todos los niveles de la carrera investigadora, desde los estudiantes predoctorales, pasando por los investigadores posdoctorales hasta llegar incluso a los investigadores consolidados. Aun así, esto no me detuvo y empecé a desarrollar una propuesta para irme a trabajar al laboratorio del Prof. Hugh Piggins en Manchester. Desde que hice la estancia durante el doctorado en Manchester tenía claro que me encantaría volver, el ambiente científico y la ciudad me ofrecían todo lo que necesitaba. Este laboratorio contaba con todos los modelos

animales y metodologías necesarias para llevar a cabo el estudio de los ritmos biológicos desde una perspectiva innovadora integrando los niveles molecular, celular, tisular, hasta el organismo completo incluyendo muchas tecnologías aún no disponibles en Murcia. Un año tras acabar la tesis, tuve la suerte de conseguir una beca de formación posdoctoral de la Fundación Séneca para investigar en Manchester. El proyecto que estoy llevando a cabo pretende profundizar en el conocimiento de los mecanismos básicos que controlan los ritmos diarios del sistema de “recompensa” y de cómo su disrupción puede alterar las respuestas de motivación y recompensa y contribuir a la fisiopatología de los trastornos neuropsiquiátricos y del estado de ánimo (ej. esquizofrenia y depresión) y al desarrollo de determinadas adicciones. A lo largo de este tiempo en Manchester mi proceso de aprendizaje ha sido exponencial, he adquirido formación y una gran experiencia en técnicas de registro de bioluminiscencia en cultivos de distintos tejidos para poder analizar la expresión de genes reloj durante varios días (figura 5), además de técnicas de electrofisiología (figura 6).



**Figura 6.** Fotografía del equipo que utilizamos en el laboratorio de electrofisiología (*Faculty of Life Sciences*, Universidad de Manchester) para llevar a cabo el registro de la actividad eléctrica neuronal *in vitro*.

Con estas metodologías somos capaces de “mirar” y registrar el comportamiento de múltiples neuronas generando una inmensa cantidad de datos que posteriormente nos servirán para el desarrollo de modelos matemáticos que nos ayuden a entender el funcionamiento de los procesos biológicos implicados. Los resultados de este proyecto presentan pues un gran interés científico en el campo de los ritmos biológicos y la psiquiatría biológica ya que supondrán un avance en el conocimiento de la influencia circadiana en los procesos de recompensa.

## PERSPECTIVAS DE FUTURO

Mucho ha llovido, quizá no en Murcia, pero sí en Manchester, desde que llegué por primera vez a la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia. Aquella llegada no solo me abrió las puertas a una educación pública sino que también abrió mi mente y me permitió descubrir en la investigación una filosofía de vida. Aunque el futuro de los

investigadores es bastante incierto, el tiempo siempre será nuestro compañero de viaje.

## REFERENCIAS

- Belle, M.D. (2015). Circadian tick-talking across the neuroendocrine system and suprachiasmatic nuclei circuits: the enigmatic communication between the molecular and electrical membrane clocks. *J Neuroendocrinol*, 27, 567-576.
- Cannon, W.B. (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews*, 3, 399-431.
- DeCoursey, P.J. (2004). Overview of biological timing from unicells to humans. In *Chronobiology: Biological Timekeeping*, eds. Dunlap JC, Loros JJ, & DeCoursey PJ, pp. 2-24. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Dibner, C., Schibler, U. y Albrecht, U. (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol*, 72, 517-549.
- Garaulet, M. y Madrid, J.A. (2009). Chronobiology, genetics and metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol*, 20, 127-134.
- Guilting, C., Hughes, A.T. y Piggins, H.D. (2010). Circadian oscillators in the epithalamus. *Neuroscience*, 169, 1630-1639.
- Guilting, C. y Piggins, H.D. (2007). Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *Eur J Neurosci*, 25, 3195-3216.
- Kas, M.J. y Edgar DM. (1999). A nonphotic stimulus inverts the diurnal-nocturnal phase preference in *Octodon degus*. *J Neurosci*, 19, 328-333.
- Lax, P., Ojalora, B.B., Esquivá, G., Rol, M.A., Madrid, J.A. y Cuenca, N. (2011). Circadian dysfunction in P23H rhodopsin transgenic rats: effects of exogenous melatonin. *J Pineal Res*, 50, 183-191.
- Lee, T.M. (2004). *Octodon degus*: a diurnal, social, and long-lived rodent. *ILAR J*, 45, 14-24.
- McClung, C.A. (2013). How might circadian rhythms control mood? Let me count the ways. *Biol Psychiatry*, 74, 242-249.
- Ojalora, B.B., Hagenauer, M.H., Rol, M.A., Madrid, J.A. y Lee, T.M. (2013). Period gene expression in the brain of a dual-phasing rodent, *the Octodon degus*. *J Biol Rhythms*, 28, 249-261.
- Otalora, B.B., Madrid, J.A., Alvarez, N., Vicente, V. y Rol, M.A. (2008). Effects of exogenous melatonin and circadian synchronization on tumor progression in melanoma-bearing C57BL6 mice. *J Pineal Res*, 44, 307-315.
- Otalora, B.B., Popovic, N., Gambini, J., Popovic, M., Viña, J., Bonet-Costa, V., Reiter, R.J., Camello, P.J., Rol, M.Á. y Madrid, J.A. (2012). Circadian system functionality, hippocampal oxidative stress, and spatial memory in the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> transgenic model of Alzheimer disease: effects of melatonin or ramelteon. *Chronobiol Int*, 29, 822-834.
- Otalora, B.B., Vivanco, P., Madariaga, A.M., Madrid, J.A. y Rol, M.A. (2010). Internal temporal order in the circadian system of a dual-phasing rodent, *the Octodon degus*. *Chronobiol Int*, 27, 1564-1579.
- Pandi-Perumal, S.R., Srinivasan, V., Maestroni, G.J., Cardinali, D.P., Poeggeler, B. y Hardeland, R. (2006). Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*, 273, 2813-2838.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Korkmaz, A., Erren, T.C., Piekarski, C., Tamura, H. y Manchester, L.C. (2007). Light at night, chronodisruption, melatonin suppression, and cancer risk: a review. *Crit Rev Oncog*, 13, 303-328.