

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

Regulación circadiana del metabolismo y
expresión de genes reloj en células
tumoraes.

Estudios *in vivo* y en cultivos celulares

Lic. Paula Micaela Wagner

Director: Dr. Mario Eduardo Guido



C I Q U I B I C



Departamento de
QUÍMICA BIOLÓGICA
Ranwel Caputto
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC-CONICET)

Facultad de Ciencias Químicas – Universidad Nacional de Córdoba

-2019-

DIRECTOR DE LA TESIS:

Dr. Mario Eduardo Guido

COMISION DE TESIS:

Dr. José Luis Daniotti

Dra. Claudia Pellizas

Dra. Susana Rubiales

EVALUADORA EXTERNA:

Dra. Juana María Pasquini

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a la **Facultad de Ciencias Químicas** de la Universidad Nacional de Córdoba por brindarme el espacio para realizar mi carrera de posgrado.

A **CONICET, FONCyT y SECyT** por el financiamiento para llevar a cabo esta tesis.

A los **Dres. José Luis Daniotti, Claudia Pellizas y Susana Rubiales** por formar parte de mi tribunal de tesis, aportando su asesoramiento y seguimiento durante estos cinco años. Y a la **Dra. Pasquini** por aceptar ser mi evaluadora externa.

A **Mario**, mi director, por confiar en mí desde que tuvimos el primer Skype. Por abrirme las puertas de tu laboratorio y ver siempre lo positivo de mis resultados y avances. Gracias por la formación profesional que me brindaste.

Al **CIQUI** y a todas las personas que habitan el departamento por brindarme sus consejos y ayuda cuando lo necesité, ya sea por pedido de reactivos o para discutir resultados. Además, un especial agradecimiento a todo el personal de apoyo que tenemos en el CIQUI: Susi y Gabi de cultivo, Carlitos, Pilar y Ceci de microscopia, Dani de facemes, y Lau, Gime y Rosita por cuidar de mis ratones. Gracias por su ayuda que facilitaron mis experimentos.

A todos los integrantes del Lab Guido durante estos cinco años: **Nico, Luis, Merce, Meli, Nati, Manu, Ine, María Ana y Edu**. Por su compañía diaria, consejos y seminarios de viernes llenos de carbohidratos. Y sin olvidarme de nuestra integrante adoptada, **Geri**, con quién formé una linda amistad más allá del lab.

En especial, a mis compañeros de mesada, **Maxi y Nati** con quienes compartí más que una mesada de laboratorio. Me quedan muchos recuerdos y anécdotas de estos años, especialmente, el sonido de la cabra o del gallo de la mesada de Maxi. Son una gran compañía para mí y fueron un sostén importante en esta tesis. Siempre tendré en mi mente cuanto nos reímos con la Vimentina y el PER nuclear. Maxi, no tengo palabras para describir el dibujo que me hiciste, y Nati, espero que nunca nos quedemos sin momentos compartidos para viborear.

A **César**, quién me adoptó desde el primer momento y me levantó del piso, literalmente, muchas veces durante estos años. Gracias por tu compromiso y voluntad con nuestros ratones, porque no existieron fines ni feriados en nuestros experimentos. Además de ser mi padrino científico fuiste un gran consejero tanto en el lab como en mi vida diaria. María Paula está muy agradecida por tu apoyo.

A **Flor y Benja**, mis compañeros de la facu, por cada after que compartimos para ahogar penas de laboratorio. Por las reiteradas charlas de paper rechazados, becas, y experimentos que al final una pinta solucionaba mucho.

A mi familia, **Adrián, Silvia, Lucas, Peto y Luisito** por ser parte de mi vida. A mis papás que me apoyaron siempre en lo que quise hacer sin ningún cuestionamiento. Y a mis hermanos por todos los viajes que compartimos estos años.

A **Gonzalo**, el complemento de mi vida. No tengo palabras de agradecimiento por todo tu apoyo. Esta tesis fueron largos cinco años en los cuales siempre estuviste conmigo, soportando mis chinchas, mis llantos y mis alegrías. Gracias por tu compañía incondicional y por cada abrazo que me diste cuando sabías que los experimentos no iban bien. Y a la **Feli**, por su compañía durmiendo al lado mío mientras escribía esta tesis.

En definitiva, a todos los que me acompañaron durante este largo camino llamado tesis soportando mis cambios de humor repentinos, mis altibajos y mis alegrías. Valoro mucho el apoyo que recibí estos cinco años. ¡GRACIAS!

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO I: INTRODUCCION Y OBJETIVOS.....	5
1.1 RITMOS BIOLÓGICOS	5
1.2 EL SISTEMA CIRCADIANO	6
1.2.1 Características de los ritmos circadianos.....	6
1.2.2 Organización del sistema circadiano.....	8
1.2.3 Reloj central y osciladores periféricos	9
1.2.4 Mecanismo molecular del reloj circadiano en mamíferos.....	10
1.2.4.1 Ciclos secundarios que conectan el oscilador central a la fisiología celular	13
1.2.5 Reloj metabólico	15
1.2.5.1 Oscilaciones en los ciclos de reducción/oxidación de peroxirredoxinas.....	17
1.3 METABOLISMO LIPÍDICO.....	18
1.3.1 Glicerofosfolípidos	19
1.3.1.1 Síntesis de novo de glicerofosfolípidos	19
1.3.2 Gotas lipídicas	21
1.3.3 Implicancias del sistema circadiano en el metabolismo lipídico	22
1.3.4 Pérdida de función de genes reloj asociado a disfunciones metabólicas.....	23
1.4 RITMOS BIOLÓGICOS Y CÁNCER	23
1.4.1 Implicancias de la disrupción del sistema circadiano en el desarrollo de cáncer.....	24
1.4.2 Cronoterapia	26
1.5 ANTECEDENTES DE RITMOS CIRCADIANOS, METABOLISMO Y CÁNCER.....	28
1.6 OBJETIVO GENERAL:	30
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1 CULTIVO Y REPIQUE DE CÉLULAS	31
2.1.1 Células T98G.....	31
2.1.2 Células A530.....	31
2.1.3 Células B16	32
2.2 CONTROL DE CONTAMINACIÓN POR MICOPLASMA.....	32
2.3 SINCRONIZACIÓN DE CULTIVOS CELULARES	32
2.4 MANEJO DE ANIMALES.....	33
2.5 TINCIÓN CON IODURO DE PROPIDIO Y CITOMETRÍA DE FLUJO.	33
2.6 EXTRACCIÓN Y TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE ARN	34
2.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) A TIEMPO FINAL	34

2.8	EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT	35
2.9	EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE INMUNOCITOQUÍMICA.....	36
2.10	DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	36
2.11	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FRÍO DE LÍPIDOS Y SEPARACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA.....	37
2.12	DETERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA FOSFOHIDROLASA DE ÁCIDO FOSFÁTICO.....	37
2.13	TRATAMIENTO CON BORTEZOMIB Y DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	38
2.14	DISRUPCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BMAL1 MEDIANTE LA TECNOLOGÍA CRISPR/CAS9.....	39
2.15	TRATAMIENTO CON SR9009 EN CÉLULAS T98G Y DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR	39
2.16	ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS T98G TRATADAS CON SR9009	40
2.17	DETERMINACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL	40
2.18	DETERMINACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	41
2.19	GENOTIPIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS A530	41
2.20	GENERACIÓN DE TUMORES A PARTIR DE LA INYECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES.....	42
2.21	DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO TUMORAL.....	43
2.22	TRATAMIENTO QUIMIOTERAPEUTICO DE TUMORES PROVENIENTES DE CÉLULAS A530	43
2.23	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	44
	CAPITULO III: OSCILACIONES METABÓLICAS Y SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUMORALES EN CÉLULAS T98G.....	45
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
3.2	RESULTADOS.....	45
3.2.1	Caracterización de las células T98G en cultivo	45
3.2.1.1	Distribución de las fases del ciclo celular	45
3.2.1.2	Caracterización de las células T98G E1.....	46
3.2.2	Oscilaciones metabólicas en células T98G.....	48
3.2.2.1	Variaciones temporales en el contenido frío de lípidos.....	49
3.2.2.2	Determinación de la actividad total de la enzima fosfohidrolasa de ácido fosfatídico	50
3.2.2.3	Determinación de los niveles de las especies reactivas del oxígeno	51
3.2.2.4	Ciclo de reducción y oxidación de peroxirredoxinas	53
3.2.3	Susceptibilidad de células T98G al tratamiento con drogas antitumorales	54
3.2.3.1	Susceptibilidad al tratamiento con Bortezomib.....	54
3.2.3.2	Susceptibilidad al tratamiento con SR9009.....	56
3.2.3.2.1	<i>Distribución del ciclo celular</i>	58
3.2.3.2.2	<i>Determinación de gotas lipídicas</i>	59
3.2.3.2.3	<i>Determinación de especies reactivas de oxígeno</i>	61

3.3 DISCUSIÓN	62
CAPÍTULO IV: CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS A530 EN CULTIVO Y ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	70
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	70
4.2 RESULTADOS.....	70
4.2.1 Caracterización de las células A530 en cultivo	70
4.2.1.1 Variaciones temporales en la expresión de BMAL1 y PER1	72
4.2.1.2 Determinación de los niveles de especies reactivas de oxígeno.....	73
4.2.1.3 Respuesta diferencial al tratamiento con Bortezomib.....	74
4.2.1.4 Caracterización de las células A530 A5	74
4.2.2 Determinación de la velocidad de crecimiento de células A530 inyectadas en ratones C57BL/6 mantenidos en ciclos regulares de LO	75
4.2.3 Determinación de la velocidad de crecimiento de células A530 inyectadas en ratones C57BL/6 mantenidos en oscuridad constante	77
4.2.4 Determinación de la velocidad de crecimiento de células A530 y A530 A5 inyectadas en ratones	78
4.2.5 Determinación de la velocidad de crecimiento de células B16 inyectadas en ratones C57BL/6 mantenidos en ciclos regulares de LO	78
4.2.4 Tratamiento quimioterapéutico de tumores provenientes de células A530.....	80
4.3 DISCUSIÓN	81
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES GENERALES	86
CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA.....	89
ÍNDICES	106

RESUMEN

La regulación temporal de procesos celulares en una escala de 24 h probablemente haya surgido como una respuesta adaptativa a los ciclos día/noche y contribuido a la evolución de osciladores circadianos en diversos organismos, desde cianobacterias unicelulares fotosintéticas hasta animales heterótrofos multicelulares. Los ritmos circadianos (del latín, *circa* cercano, *diem* día) regulan numerosos procesos fisiológicos, incluyendo ciclos de sueño/vigilia, comportamiento y actividad locomotora, ciclos de temperatura corporal, funciones inmunes, metabólicas y del sistema endocrino y procesos cardiovasculares y digestivos. En consecuencia, los estilos de vida moderna (incremento de la luz en la noche, trabajos rotativos, jet lag, etc.) que alteran el equilibrio entre el sistema circadiano y el ambiente han sido asociados con un incremento en el riesgo de cáncer, desordenes metabólicos y enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares.

Durante el trabajo de esta tesis nos planteamos estudiar la regulación temporal del metabolismo en células tumorales T98G provenientes de glioblastoma humano y la implicancia del sistema circadiano en la respuesta a drogas antitumorales. Los resultados evidenciaron oscilaciones metabólicas en el contenido endógeno de glicerofosfolípidos (GFLs) y actividad *in vitro* de la enzima fosfatidato fosfohidrolasa como también en el estado redox de las células T98G. A su vez, estas células exhibieron una respuesta diferencial en el tiempo al ser tratadas con el quimioterapéutico Bortezomib (inhibidor del proteosoma) con mayor susceptibilidad en una ventana temporal entre las 12 y 24 h luego de la sincronización con dexametasona. Luego de alterar la expresión del activador molecular *Bmal1* mediante la tecnología CRISPR/Cas9, observamos una fuerte interacción entre el oscilador metabólico/redox y la maquinaria circadiana transcripcional, dado que los ciclos redox fueron sustancialmente alterados y la respuesta temporal a la susceptibilidad al Bortezomib mostró un adelanto de fase de 6 h respecto a las células T98G control. Por otro lado, la modulación farmacológica del reloj circadiano a través de agonistas sintéticos (SR9009) de los genes reloj represores REV-ERBs evidenció efectos antiproliferativos en células T98G alterando la progresión del ciclo celular y la acumulación de lípidos en células tumorales.

Por último, evaluamos la velocidad de crecimiento de tumores provenientes de células A530 derivadas del sistema nervioso periférico o B16 de melanoma murino inyectadas en ratones C57BL/6 bajo distintas condiciones experimentales. Estos resultados evidenciaron una mayor tasa de crecimiento tumoral en aquellos ratones inyectados al comienzo de la noche respecto a los animales inyectados al comienzo del día que provenían de ciclos regulares de luz: oscuridad (LO). Resultados similares fueron observados cuando los animales fueron mantenidos en oscuridad constante (OO) luego de la sincronización a un ciclo regular de LO e inyectados al comienzo del día o noche subjetiva.

Otra serie de experimentos evidenciaron una mayor tasa de crecimiento en los tumores provenientes de células A530 que tenían disminuida la expresión de *Bmal1* respecto a las células control.

En conjunto, los resultados de esta tesis sugieren una fuerte interacción entre el oscilador metabólico/redox y la maquinaria transcripcional, como así también una regulación temporal por parte del reloj circadiano sobre el crecimiento tumoral.

ABSTRACT

Temporal regulation of cellular processes on a 24-hour scale has probably evolved as an adaptative response to the day/night cycles and contributed to the evolution of circadian oscillators in various organisms, from photosynthetic unicellular cyanobacteria to multicellular heterotrophic animals. Circadian rhythms (from Latin, circa meaning "around", and diēm, meaning "day") regulate several physiological processes, including sleep/wake cycles, behavior and locomotor activity, body temperature cycles, cardiovascular and digestive processes, endocrine systems and metabolic and immune functions. Thus, human lifestyles (for example, exposure to abnormal lighting schedules, shift work, jet lag, etc.) that disrupt homeostasis between timing systems and external environment has been associated with an increased risk of cancer, metabolic disorders and cardiovascular and cerebrovascular disease.

Here we investigated the temporal regulation of metabolism on human glioblastoma T98G cells and its implication in the response to antitumoral drugs. The results showed metabolic oscillations in endogenous lipid content and *in vitro* activity of phosphatide phosphohydrolase enzyme as also in redox state of T98G cells. In addition, T98G cells displayed a temporal response after proteosomal inhibitor Bortezomib treatment with the lowest levels of viability in a time window ranging between 12 and 24 h post-synchronization. A possible cross-talk between redox/metabolic oscillator and transcriptional machinery was observed since redox cycles were substantially altered and the temporal response to chemotherapeutic Bortezomib showed a 6 h phase advance after *Bmal1* knockdown by CRISPR/Cas9 technology as compared to control T98G cells. On the other hand, pharmacological modulation of the circadian clock by REV-ERBs synthetic agonists (SR9009) showed antiproliferative effects on T98G cells altering cell cycle progression and lipid accumulation on tumor cells.

Finally, we evaluated tumor growth rate of A530 or B16 cells injected on C57BL/6 mice under different experimental conditions. These results showed a higher tumor growth rate when mice were injected at night as compared with those injected at the beginning of the day in animals maintained in a light: dark (LD) regular cycle as well when they were released to constant dark (DD) after LD synchronization and injected at the beginning of subjective day or night. Moreover, our results

demonstrated a higher growth rate of tumors coming from A530 cells that had decreased *Bmal1* expression as compared with control cells.

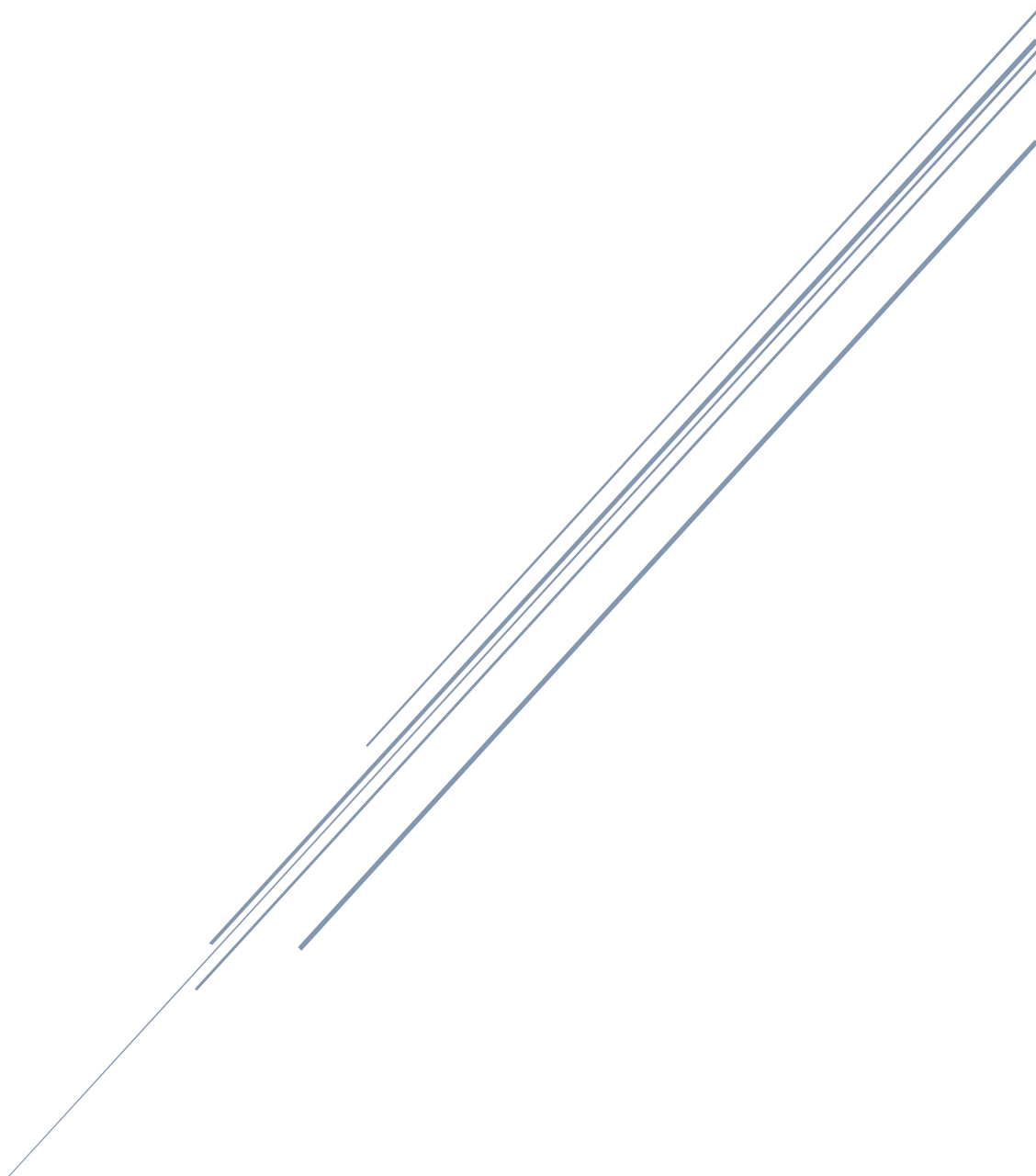
Overall, our experiments suggest a cross-talk between metabolic/redox oscillator and transcriptional circadian circuit as well as a temporal regulation by the circadian clock on tumor growth.

ABREVIATURAS

µg Microgramo	LPA Ácido lisofosfatídico
ADN Ácido desoxirribonucleico	LPAAT Lisofosfatídico aciltransferasa
AMPc Adenosín monofosfato cíclico	MAG Monoacilglicerol
ARN Ácido ribonucleico	mM Milimolar
ARNm Ácido ribonucleico mensajero	MTT 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol
BOR Bortezomib	M-W Mann Whitney
CCT CTP-Fosfocolina citidiltransferasa	NaCl Cloruro de Sodio
CK Colina quinasa	NAD Nicotinamida adenina dinucleótido
CO₂ Dióxido de carbono	NAMPT Nicotinamida fosforribosil transferasa
CREB Elementos de respuesta a AMPc	nm nanómetros
DAG Diacilglicerol	NSQ Núcleo supraquiasmático
DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol	OO Oscuridad:Oscuridad
DCF 2'-7'-dicloro-fluoresceína	PA Ácido fosfatídico
DCFH-DA 2'-7'-Diacetato de dicloro-dihidro- fluoresceína	PAP Fosfatidato fosfohidrolasa
DEX Dexametasona	PARP-1 ADP ribosil transferasa
DMSO Dimetil sulfóxido	PBS Buffer fosfato salino
dNTPs Desoxirribonucleótidos trifosfato	PC Fosfatidilcolina
DO Densidad óptica	PCR Reacción en cadena de la polimerasa
ECT CTP-Fosfoetanolamina citidiltransferasa	PE Fosfatidiletanolamina
EGF Epidermal growth factor	PRX Peroxirredoxinas
EK Etanolamina quinasa	RHT Tracto retino-hipotalámico
EPT CDP-Etanolamina 1,2 diacilglicerol Etanolamina Fosfotransferasa	RO Oscilador redox
FGF Fibroblast growth factor	ROS Especies reactivas de oxígeno
GCR Genes controlados por el reloj	RT Radioterapia
GFAP proteína fibrilar ácida glial	SDS Dodecilsulfato sódico
GFLs Glicerofosfolípidos	SFB Suero fetal bovino
GPAT Glicerol-3-Fosfato Aciltransferasa	sgRNA ARN guías
GR Receptores de Glucocorticoides	SRF Factores de respuesta a suero
GS Glutamina sintasa	TAG Triacilglicerol
HSEs Elementos de choque término	Tbp TATA-binding protein
ICC Inmunocitoquímica	TLC Cromatografía en capa delgada
ipRGCs Células de la retina ganglionares intrínsecamente fotosensibles	TMZ Temozolomida
KO Knockout	TTFL Transcription–translation feedback loop
K-W Kruskal-Wallis	UA Unidades arbitrarias
LDs Gotas lipídicas	Vim Vimentina
LO Luz: Oscuridad	WT Wild-type
	ZT Zeitgeber time
	µM Micromolar

CAPITULO I

Introducción y objetivos



CAPÍTULO I: INTRODUCCION Y OBJETIVOS

1.1 RITMOS BIOLÓGICOS

La vida evolucionó con cambios diarios predecibles en la luz, temperatura, y disponibilidad de comida. Considerando el sol como la fuente principal de energía para organismos fotosintéticos, existió una fuerte presión evolutiva para producir carbohidratos durante el día conjuntamente con una mayor fotólisis del agua, y almacenarlos para ser utilizados durante el “ayuno nocturno”. Esto podría haber dado lugar a los ritmos diarios en el metabolismo permitiendo que vías anabólicas y catabólicas operen en diferentes momentos del día. Los ritmos biológicos son propiedades fundamentales de la mayoría de los organismos vivos estudiados hasta el momento. Ciclos anuales, diarios y lunares de actividad biológica han sido descritos en cianobacterias, protistas, protozoos, hongos filamentosos, plantas y animales [1, 2].

Dentro de la clasificación de ritmos biológicos, podemos nombrar:

Ritmos circadianos: ciclos de 24 h que incluyen ritmos fisiológicos y comportamentales como por ejemplo los ciclos de sueño/vigilia, secreción de hormonas, temperatura corporal, etc.

Ritmos ultradianos: ritmos biológicos con un menor periodo y mayor frecuencia que los ritmos circadianos. Como ejemplo de estos ciclos podemos nombrar la producción de la hormona de crecimiento (3 h), el ritmo cardiaco y el ritmo respiratorio (6 s).

Ritmos infradianos: ritmos biológicos con periodos mayores a las 24 h, como por ejemplo el ciclo menstrual, la floración de plantas y migración de aves.

A partir de la curva periódica que representa la oscilación de un dado proceso es posible definir distintos parámetros matemáticos que caracterizan a la oscilación (*Ilustración 1*). Por ejemplo, el **periodo** es la longitud exacta de tiempo desde el primer pico de actividad hasta el próximo. La **amplitud (A)** indica la magnitud de la oscilación, es decir, el valor porcentual entre el máximo (o mínimo) y valor promedio alrededor el cual oscila la función (mesor), y la **fase** es el tiempo en el cual la actividad es máxima.

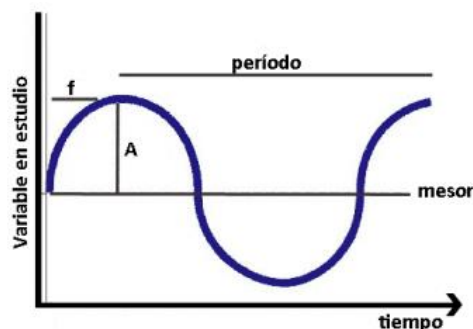


Ilustración 1: Función temporal periódica y sus parámetros característicos.

La regulación temporal de procesos celulares en una escala de 24 h probablemente haya surgido como una respuesta adaptativa y contribuido a la evolución de osciladores circadianos en diversos organismos, desde cianobacterias unicelulares fotosintéticas hasta animales heterótrofos multicelulares [3]. En Cronobiología, los ritmos circadianos son los más estudiados y representan el eje de esta tesis.

1.2 EL SISTEMA CIRCADIANO

Las oscilaciones circadianas son ritmos de 24 h autosostenidos bajo condiciones constantes. Sin embargo, poseen plasticidad para integrar los cambios intracelulares y ambientales a fin de regular un conjunto de diversas funciones celulares y optimizar la adaptación. Los ritmos circadianos observados en procesos bioquímicos, fisiológicos y comportamentales persisten bajo condiciones constantes de iluminación, temperatura y otras variables ambientales con un periodo cercano al día, cuya fase puede resetearse por una breve interrupción en el régimen constante, y cuyo periodo es relativamente independiente de la temperatura y nutrición dentro de un rango fisiológico de crecimiento normal [4].

1.2.1 Características de los ritmos circadianos

El factor “tiempo” es un elemento central de todos los procesos biológicos. Todos los organismos vivos poseen sistemas de medición de tiempo inherentes designados para coordinar comportamientos cíclicos y respuestas fisiológicas. Entre estos sistemas, el reloj biológico trabaja en la anticipación de cambios recurrentes como las variaciones diarias de las condiciones ambientales impuestas por la rotación de la Tierra, incluyendo los ciclos luz/oscuridad, las oscilaciones de temperatura y disponibilidad de alimentos. Como fue mencionado anteriormente, los ritmos que poseen una periodicidad cercana a las 24 h son denominados “circadianos” (del latín, *circa* cercano, *diem* día), habitualmente con periodos entre 20-28 h.

En 1729, Jacques de Mairan en París (Francia), observó que el movimiento de las hojas de la planta del género *Mimosa* (extendidas durante el día y retraídas durante la noche) se mantenía durante varios días aun en condiciones constantes de oscuridad. Este experimento fue considerado el primero en el área de la Cronobiología evidenciando el carácter persistente de los ritmos en ausencia de señales externas (conocido como corrida libre o *free running*). Luego de una serie de estudios, se postuló que el sistema circadiano genera ritmos cercanos a las 24 h de actividad aun en ausencia de señales periódicas ambientales, demostrando la existencia de un mecanismo endógeno [5]. Otra característica importante de los ritmos circadianos, es la compensación por la temperatura; es decir, los relojes biológicos no funcionarían más lento a bajas temperaturas o se acelerarían a mayores temperaturas.

La persistencia de los ritmos circadianos en condiciones ambientales constantes no implica que esos ritmos sean independientes de las variaciones ambientales, ya que algunos cambios en el ambiente modulan el período de estos ritmos [3]. A estos cambios en el ambiente que modulan el periodo o la fase de los ritmos circadianos se los ha denominado agentes sincronizantes o *Zeitgebers* (de alemán “*dadores del tiempo*”). Efectivamente, es otra característica típica de los relojes biológicos que hace a la puesta en hora del día a día de todas las actividades rítmicas.

Los principales agentes sincronizantes de estos ritmos son los ciclos de iluminación [6, 7], ciclos de temperatura ambiental [8], ciclos de alimentación [6, 7] y ciclos de estimulación social [9, 10]. Estas señales ambientales que ajustan al organismo con su entorno constituyen las **vías de entrada** (*input*; *Ilustración 2 y 3*) del sistema circadiano.

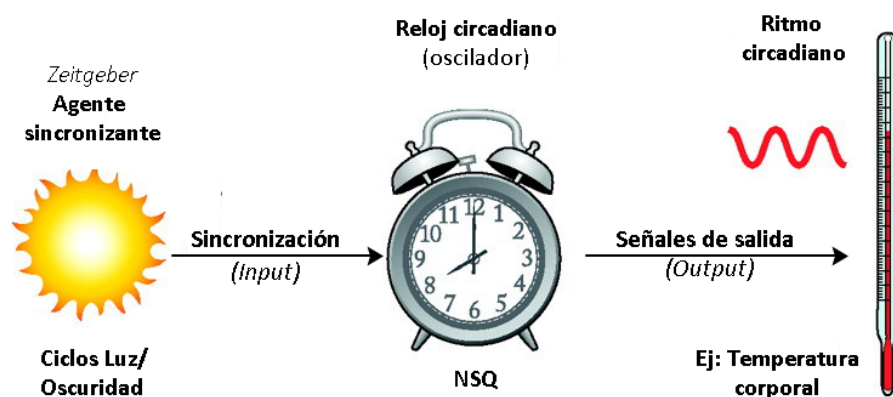


Ilustración 2: Esquema simplificado del sistema circadiano. Modelo lineal que incluye un oscilador endógeno (NSQ, núcleo supraquiasmático), el agente sincronizante ambiental (*Zeitgeber*), y una señal de salida que gobierna los ritmos biológicos. Adaptado de Golombek y Rosenstein [11].

Los osciladores circadianos en ratones y humanos mantenidos en corrida libre (condiciones ambientales constantes) presentan periodos ligeramente inferiores y superiores a las 24 h, respectivamente. Por lo tanto, estos osciladores deben reajustarse o sincronizarse cada día por unos minutos para mantenerse en sintonía con el tiempo geofísico. Para ello, la señal fótica (ciclos de luz/oscuridad) es captada y transmitida directamente desde la retina a través del tracto retino-hipotalámico (RHT) [12–15]. El núcleo supraquiasmático (NSQ) sincroniza a los relojes periféricos mediante **señales de salida** (*output*; *Ilustración 2 y 3*) por la inervación directa vía sistema nervioso autónomo, señales sistémicas (hormonales) tales como los glucocorticoides que cambian más de 10 veces a lo largo del día, cambios en la temperatura corporal y control sobre la alimentación [16–19].

Es de destacar que los ritmos biológicos se observan a distintos niveles de organización (organismos, tejidos, órganos) e incluso en células individuales. Es así, que Balsalobre y colaboradores utilizaron fibroblastos de rata y células de hepatoma para demostrar que un *shock* de suero es capaz de inducir la expresión circadiana de los genes *rPer1* y *rPer2* (homólogos en rata del gen reloj Período de *Drosophila*), y genes que codifican para los factores de transcripción REV-ERB α , DBP y TEF. En fibroblastos de rata, las oscilaciones se mantuvieron durante tres días consecutivos con un periodo promedio de 22.5 h. Este *shock* de suero también induce la estimulación transiente de la expresión de genes *c-fos* y *rPer* lo cual se asemeja con la expresión temprana de genes inducidos por la luz en el NSQ [20].

1.2.2 Organización del sistema circadiano

El sistema circadiano se organiza de manera jerárquica como puede observarse en la Ilustración 3. Dicho sistema en mamíferos comprende tres elementos básicos:

a) **Marcapasos central o reloj maestro**, ubicado en el NSQ. Es el sitio neuro-anatómico donde se generan las señales oscilatorias intrínsecas, con un periodo cercano a las 24 h. La ablación del NSQ conlleva a la pérdida de ritmicidad de numerosos procesos fisiológicos y conductuales.

b) **Osciladores periféricos**, ubicados en órganos y tejidos y controlados por vías de salida del NSQ hacia los sistemas efectores necesarios para la expresión rítmica.

c) **Sincronización**, como la vía RTH, responsable de llevar la información lumínica directamente al reloj y sincronizar al ciclo Luz/Oscuridad (LO) ambiental. Esta constituye la vía de sincronización más importante del reloj circadiano. A su vez, existen otras vías de entrada que llevan información “especial” al reloj (estado de alerta, aumento de la actividad, factores endocrinos y neurotransmisores) y que también son capaces de sincronizar al NSQ.

Distintos estudios demuestran que lesiones en el NSQ causan desincronía con los **relojes periféricos**. Sin embargo, las células individuales retienen la capacidad de generar oscilaciones en la transcripción de genes [21]. En este escenario, el NSQ podría compararse con el director de una orquesta, en ausencia del mismo, los músicos individuales continúan tocando de manera desincronizada, pero el ritmo pronto se perdería si los músicos no pudieran responder a otras señales para mantenerse sincronizados.

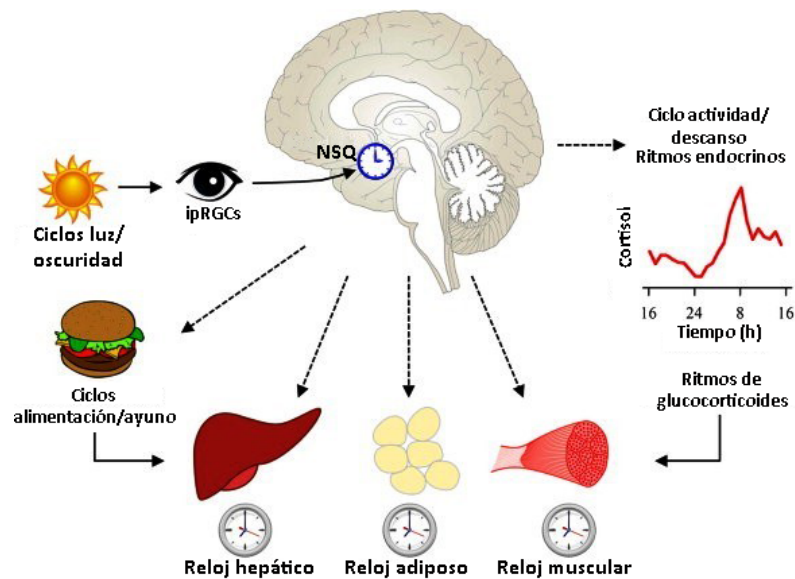


Ilustración 3: Organización jerárquica del sistema circadiano. El reloj maestro en el NSQ es sincronizado por los ciclos solares a través de la activación de células de la retina ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs) que proyectan directamente al NSQ. Este, a su vez, sincroniza ritmos endocrinos y comportamentales para coordinar temporalmente los relojes circadianos localizados en tejidos periféricos a través de señales tales como hormonas, glucocorticoides, cortisol, etc. Los ciclos de alimentación/ayuno también puede sincronizar relojes en tejidos metabólicos independientes del ritmo de actividad neural del NSQ [22].

1.2.3 Reloj central y osciladores periféricos

Como fue nombrado anteriormente, el **reloj central** en los mamíferos está ubicado en el NSQ del hipotálamo, inmediatamente por encima del quiasma óptico. Las primeras evidencias basadas en las proyecciones directas desde la retina a través del tracto RTH fueron publicadas en 1972 por R.Y. Moore y su grupo colaborador. El NSQ es el reloj maestro para la generación y/o coordinación de todos los procesos moleculares, bioquímicos, fisiológicos y comportamentales en los mamíferos estudiados hasta el momento [23].

La ablación quirúrgica del NSQ en varias especies de roedores (ratas, ratones y hámsteres) suprime la expresión de un conjunto de ritmos circadianos y no responden a los ciclos de LO [23, 24]. Esto puede deberse a que el NSQ de todas las especies estudiadas recibe señales directas por la vía RHT requerida para la sincronización [24, 25]. Los explantos de tejido de NSQ, células dispersas de NSQ, e incluso células inmortalizadas derivadas de NSQ embrionario de rata expresan perfiles circadianos en la expresión de genes, actividad metabólica, secreción de péptidos y actividad eléctrica *in vitro* [26–29]. Por último, el trasplante de tejido embrionario de NSQ o células inmortalizadas del NSQ en el tercer ventrículo confiere/restaura ritmos circadianos en la actividad comportamental en roedores arrítmicos previamente lesionados en el NSQ [30–33].

El NSQ está compuesto por alrededor de 20000 neuronas, para cada una de las cuales se postula que posee un oscilador circadiano autónomo. El NSQ funciona como una red en la cual su

población de células se encuentra acoplada y oscila de manera coherente [34]. La dinámica de la coordinación espacial y temporal de los ritmos en el NSQ ha sido estudiada con el advenimiento de la tecnología de genes circadianos reporteros, lo cual reveló una complejidad inesperada en la arquitectura temporal del núcleo [35, 36]. A nivel de célula única, las neuronas del NSQ exhiben un amplio rango de periodos circadianos autónomos que varían entre 22 a 30 h [37, 38].

Posteriormente, diferentes grupos de investigación pusieron de manifiesto la presencia de osciladores alojados en diferentes órganos y tejidos dentro del organismo, los cuales fueron denominados **osciladores periféricos**. Entre ellos, el hígado, retina, riñón, páncreas, glándula adrenal, tejido adiposo, corazón y músculo esquelético [12, 16, 21, 39–41]. Estudios realizados con cultivos de órganos de animales transgénicos y líneas celulares demostraron que los osciladores periféricos presentaban ritmos circadianos tan robustos como el NSQ [20, 21, 42–44]. A su vez, Yamazaki y colaboradores han mostrado que varios tejidos periféricos poseen su propio reloj circadiano y que éstos son sincronizados por el marcapasos central en el NSQ [45]. Estos resultados cambiaron la visión respecto a los osciladores biológicos y demostraron que cada órgano/tejido e incluso células inmortalizadas en cultivo presentan osciladores autónomos a nivel celular, refutando la idea de que los osciladores circadianos sólo operaban en las neuronas del NSQ.

1.2.4 Mecanismo molecular del reloj circadiano en mamíferos

A partir de estudios genéticos y bioquímicos, en 1990 los ganadores del Premio Nobel de Medicina 2017, Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash y Michael W. Young propusieron el primer mecanismo molecular del reloj. Este modelo consistía en la expresión auto regulada de los genes *Periodo de Drosophila* a través de ciclos de retroalimentación negativa [46, 47]. Posteriormente, estos estudios se extendieron a mamíferos, aves, cianobacterias y plantas evidenciando los genes involucrados en la generación de los ritmos circadianos.

En la actualidad, se considera que el reloj molecular en mamíferos está conformado por ciclos transcripcionales/traduccionales de retroalimentación negativa denominado **TTFL** (*transcription-translation feedback loop*) [48, 49] (*Ilustración 4*). El ciclo principal involucra a los **genes activadores** *Clock* y *Bmal1* y al conjunto de **genes represores** *Periodo* (*Per1, Per2, Per3*) y *Criptocromo* (*Cry1, Cry2*). Las proteínas CLOCK y BMAL1 pertenecen a la familia de factores de transcripción con dominios de unión al ADN (bHLH: hélice-bucle-hélice) y de interacción con proteínas (PAS: Per-Arnt-Sim). Durante el día, los factores de transcripción CLOCK y BMAL1 interactúan formando un heterodímero para activar la transcripción de los genes *Per1/2/3* y *Cry1/2*, resultando en altos niveles de estos transcritos. Las proteínas resultantes PER y CRY heterodimerizan, translocan al núcleo e interactúan con el complejo CLOCK: BMAL1 para inhibir su propia transcripción y la de otros genes controlados por el reloj (GCR) que poseen sitios *E-box* en sus promotores [50]. Durante la noche, el complejo

represor PER-CRY es degradado, y el heterodímero CLOCK: BMAL1 puede luego activar un nuevo ciclo de transcripción. El ciclo entero tarda aproximadamente 24 h para completarse.

A su vez, existe un ciclo secundario de retroalimentación que está conectado con el ciclo principal CLOCK-BMAL1/PER-CRY. Este segundo ciclo transcripcional involucra a los receptos huérfanos del ácido retinoico, REV-ERB α/β y RORs, los cuales son blancos directos del heterodímero CLOCK: BMAL1. A través de las secuencias *RORE* presentes en el promotor del gen *Bmal1*, REV-ERB α/β y RORs reprimen o activan fuertemente la transcripción de dicho gen [51, 52], respectivamente.

El siguiente diagrama esquematiza la maquinaria del reloj molecular en mamíferos (*Ilustración 4*).

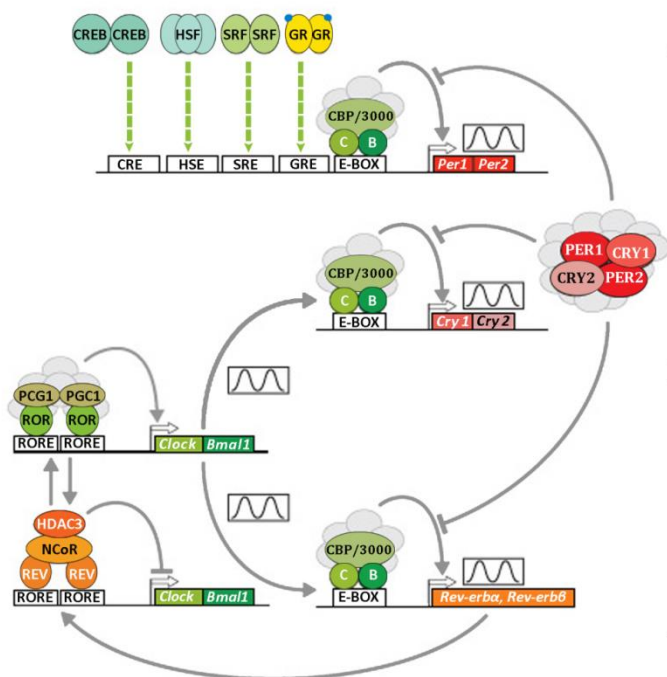


Ilustración 4: Maquinaria del reloj molecular en mamíferos.

El circuito molecular está constituido de dos ciclos negativos interconectados responsables de regular la expresión génica. Este oscilador canónico es conocido como TTFL (*transcription translation feedback loop*). Los factores de transcripción **CLOCK** (C) y **BMAL1** (B) se unen a motivos *E-box* en el ADN activando la transcripción de los genes **Per1/2** y **Cry1/2** involucrados en el ciclo principal (1), y Rev-erba β presentes en el ciclo secundario (2). Las proteínas **PER1/2** y **CRY1/2** se ensamblan en complejos represores atenuando su transactivación mediada por **CLOCK** y **BMAL1** luego de haber alcanzado un nivel umbral de actividad. Como consecuencia, los niveles de los complejos represores

PER1/2 y **CRY1/2** disminuyen hasta que dejan de inhibir la actividad de **CLOCK** y **BMAL1**; de este modo, se inicia un nuevo ciclo de transcripción de **Per1/2** y **Cry1/2**. Por otro lado, cuando las concentraciones de **REV-ERBs** son bajas, los receptores RORs se unen a elementos *RORE* en el promotor de estos dos genes y activan la transcripción del complejo co-activador PGC1. En cambio, cuando las concentraciones de **REV-ERBs** son altas, los mismos compiten con los receptores RORs por la unión a los elementos *RORE* reclutando el complejo co-represor nCoR/HDAC3. Los genes **Per1/2** también actúan como genes tempranos inmediatos en la sincronización del circuito circadiano molecular. Así, su transcripción puede ser estimulada por factores de transcripción tempranos cuya actividad está controlado por señales sistémicas, como hormonas, mensajeros secundarios, temperatura y neurotransmisores. Como factores de transcripción tempranos, podemos nombrar las proteínas de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB), de unión a elementos de choque termino (HSEs), factores de respuesta a suero (SRF) y receptores de glucocorticoides (GR). La activación de la expresión de **Per1/2** por estos factores de transcripción juega un papel importante en la fase de reinicio de los relojes circadianos. Adaptado de Bollinger y Schibler [53].

El heterodímero CLOCK: BMAL1 también regula varios genes aguas abajo conocidos como **genes controlados por el reloj** (GCR) que generan ritmos circadianos en la mayoría de los procesos

celulares tanto en neuronas del NSQ como en órganos periféricos, resultando en la expresión rítmica de 3-10% de todos los ARNm expresados en un tejido particular. Esto se debe a interacciones tiempo-dependientes entre los reguladores circadianos con secuencias de promotores de genes específicos, factores de transcripción o complejos de iniciación de transcripción, elongación y terminación, como también factores claves para regular el remodelado de cromatina [54–59]. Los GCR expresados en los tejidos estudiados incluyen reguladores del ciclo celular, proliferación, metabolismo, senescencia y respuesta a ADN dañado [60–67].

Diferentes estudios muestran que las modificaciones post-traduccionales y la degradación de las proteínas reloj son etapas críticas para determinar la periodicidad circadiana del reloj [50, 68]. Muchas de las modificaciones post-traduccionales ocurren de manera circadiana y regulan la actividad, localización subcelular y/o la vida media de las proteínas reloj, provocando un desfase entre los niveles de transcritos y su actividad transcripcional. Esto contribuye a la progresión y comienzo de un nuevo ciclo de 24 h. Entre las modificaciones post-traduccionales estudiadas, podemos nombrar: fosforilación [69–71], acetilación [55, 72], metilación [73], ubiquitinación [74], sumoilación [75, 76] y poli-ADP-ribosilación [77].

Como fue observado en *Drosophila*, las proteínas PER1 y PER2 en mamíferos son progresivamente fosforiladas a medida que se acumulan durante la tarde y noche. Las enzimas caseínas $1\delta/\epsilon$ (CK1 δ/ϵ) son quinasas claves involucradas en la fosforilación de PER y CRY. Por ejemplo, el hámster mutante *tau* posee un periodo circadiano corto de 20 h, debido a una mutación en la proteína CK1 ϵ lo que conlleva un alelo mutante negativo dominante [78]; en conjunto con otros estudios de este mutante han revelado un rol clave de CK1 ϵ y fosforilación de proteínas en la regulación del periodo circadiano en mamíferos [79]. Dicha mutación en humanos es responsable de una patología del sueño [80, 81].

Por otro lado, la fosforilación marca a las proteínas reloj para la poliubiquitinación y posterior degradación por la vía del complejo proteosoma 26S. Estudios *in vitro* involucran los complejos E3 ubiquitina ligasa β -TrCP y FBXL3 en la marcación de las proteínas PER y CRY, respectivamente, para su posterior degradación [82–86]. Mutaciones en el gen *Fbxl3* han evidenciado fenotipos de periodo más largo en ratones, debido a un defecto en la degradación de CRY1/2 [86, 87].

A partir de estudios con animales mutantes para los genes reloj fue posible dilucidar su influencia en el mecanismo del reloj molecular. En la Tabla 1 se ejemplifican mutaciones de los genes reloj y su incumbencia en el fenotipo circadiano evaluando actividad locomotriz:

Tabla 1: Fenotipos de actividad locomotriz asociado a mutaciones de genes involucrados en el mecanismo del reloj molecular.

Mutación	Fenotipo circadiano
<i>Bmal1</i> ^{-/-}	Arrítmico en oscuridad constante [88]
<i>Clock</i> Δ19	Alarga el periodo 4 h, arrítmico en oscuridad constante [89]
<i>Clock</i> ^{-/-}	Acorta el periodo 0.5 h [90]
<i>Per1</i> ^{-/-}	Acorta el periodo 0.5 h o arrítmico en oscuridad constante [91–93]
<i>Per2</i> ^{-/-}	Acorta el periodo 1.5 h con tendencia a arritmicidad [92, 94]
<i>Per1</i> ^{-/-} y <i>Per2</i> ^{-/-}	Arrítmico en oscuridad constante [91, 92]
<i>Cry1</i> ^{-/-}	Acorta el periodo 1 h [95, 96]
<i>Cry2</i> ^{-/-}	Alarga el periodo 1 h [96, 97]
CK1ε (tau)	Alarga el periodo 0.4 h [78]
CK1ε ^{-/-}	Alarga el periodo 0.3 h [79]
Rev-erba ^{-/-}	Acorta el periodo 0.5 h [51]

1.2.4.1 Ciclos secundarios que conectan el oscilador central a la fisiología celular

Además de los mecanismos post-transcripcionales y post-traduccionales descritos, existe una fuerte evidencia que procesos citosólicos tienen importantes roles en la actividad transcripcional de la maquinaria circadiana para controlar la fisiología celular [98]. Esta visión ha surgido a causa de que numerosos procesos citosólicos controlados por el reloj pueden tener retroalimentación con el oscilador transcripcional. Tales procesos conforman ciclos accesorios que conectan estrechamente el reloj circadiano al metabolismo celular.

Un ejemplo de este *feedback* metabólico es la biosíntesis de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y su vía de salvataje (*Ilustración 5*). La enzima limitante en la biosíntesis de NAD⁺, nicotinamida fosforribosil transferasa (NAMPT), es controlada a nivel transcripcional por el heterodímero CLOCK:BMAL1 en ratones, y los niveles de NAD⁺ exhiben oscilaciones circadianas en el citoplasma [99, 100]. A su vez, el equilibrio redox NAD⁺/NADH también puede regular la afinidad de unión al DNA del heterodímero NPAS2:BMAL1 [101]. Los niveles de NAD⁺ también pueden ser indirectamente transducidos de nuevo al reloj mediante la deacetilasa dependiente de NAD⁺, SIRT1, la cual deacetila a PER2 [55] y equilibra la acetilación mediada por CLOCK [59]. Aunque su actividad es impulsada por ciclos de alimentación, la enzima polimerasa de poli ADP-ribosa 1 (PARP-1), una ADP ribosil transferasa dependiente de NAD⁺, también participa en las oscilaciones de NAD⁺ dado que media la ADP ribosilación de CLOCK, modulando así la afinidad al DNA de CLOCK:BMAL1 [77].

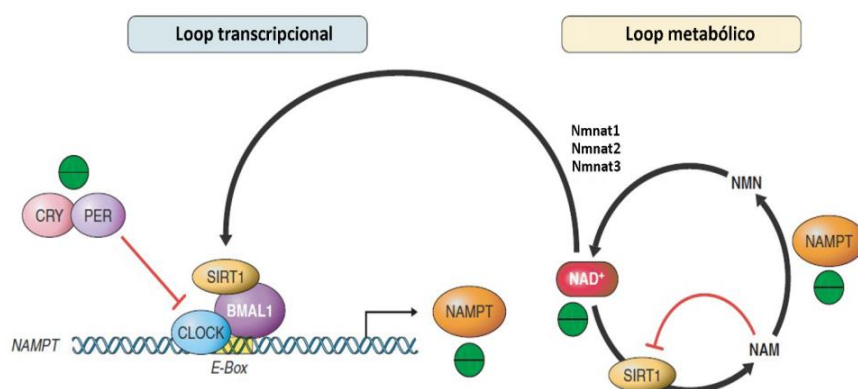


Ilustración 5: Relación entre la ritmicidad circadiana y el metabolismo. El complejo SIRT1:CLOCK:BMAL1 coordina la expresión del gen *Nampt*, que codifica para la enzima limitante en la vía de salvataje de NAD, cofactor de SIRT1. Los dos loops graficados en el esquema demuestran los mecanismos tanto del circuito de retroalimentación transcripcional como el circuito de retroalimentación enzimática. Extraído de Eckel-Mahan y Sassoni-Corsi [102].

Como se ejemplifica en la Ilustración 6, otras vías citosólicas también pueden tener *feedback* al oscilador transcripcional como AMPc, la señalización por Ca_2^+ [103], quinasa AMP [104] y niveles de glucosa [105], entre otras.

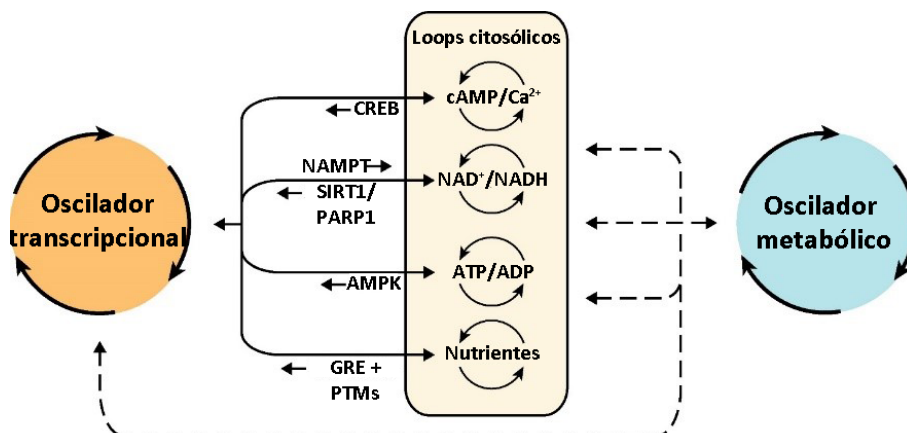


Ilustración 6: Ciclos transcripcionales, citosólicos y metabólicos. Los componentes citosólicos principalmente están involucrados en el metabolismo energético y redox formando ciclos accesorios que son controlados por el reloj transcripcional y, a su vez, se retroalimentan. Distintos estudios que analizan perturbaciones transcripcionales del actual modelo TTFL [37, 106–109] en conjunto con el descubrimiento de ritmos no transcripcionales tanto en procariontas [110] como en eucariotas [111–113], sugieren que un oscilador no transcripcional subyace a ritmos transcripcionales y citosólicos. La identidad molecular de este oscilador aún no ha sido resultado, pero la profunda conservación filogenética de los ciclos de oxidación de peroxirredoxinas indica que es de origen metabólico [111]. Extraído de Reddy y Rey [114].

Estas conexiones implicadas en mantener la homeostasis energética de la célula fortalecen aún más el link entre los relojes circadianos y las vías metabólicas evidenciando que las fronteras entre el oscilador circadiano celular y el metabolismo van desapareciendo a medida que se adquieren nuevos conocimientos. En efecto, los ciclos metabólicos celulares pueden estar acoplados a los ritmos de 24 horas en las células, y aun continuar oscilando en ausencia de genes reloj, quizás con un periodo diferente [115]. En este sentido, los niveles de NAD(P)H pueden exhibir ritmos circadianos en ausencia de una señal de entrada del oscilador transcripcional, como fue ejemplificado en células enucleadas como los glóbulos rojos [116].

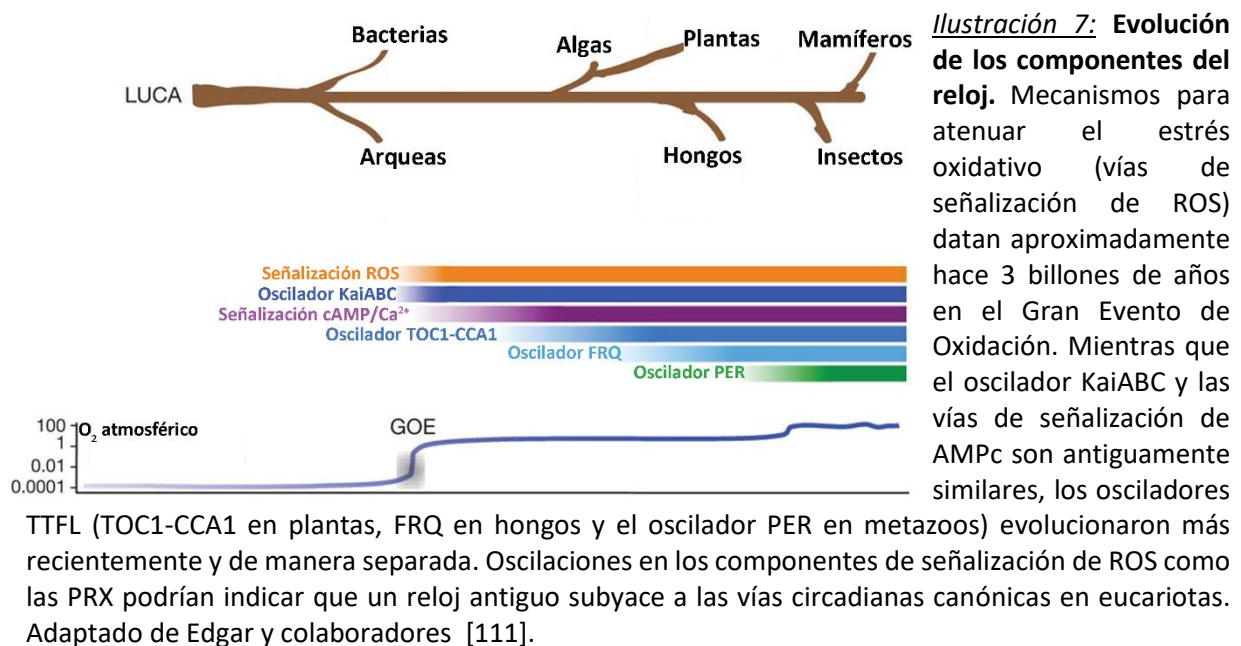
1.2.5 Reloj metabólico

La vida celular surgió hace 3.7 billones de años. Con escasa excepción, los organismos terrestres han evolucionado bajo ciclos diarios predecibles de acuerdo a la rotación de la Tierra. La ventaja conferida en tales organismos capaces de anticipar cambios ambientales ha impulsado la evolución de los relojes circadianos endógenos que sintonizan la fisiología interna con las condiciones externas. La filogenia molecular de los mecanismos que impulsan estos ritmos ha sido difícil de diseccionar dado que los genes y proteínas reloj identificadas no son conservadas entre los dominios de vida: Bacteria, Archaea y Eucaria. Si bien se ha evidenciado el modelo común denominado TTFL en todos los organismos estudiados, los componentes del mismo no son compartidos entre los organismos. Por ejemplo, el reloj molecular en cianobacterias propone 3 proteínas: Kai A, B y C; en cambio, en el hongo *Neurospora crassa*, el ciclo que coordina los ritmos involucra la proteína FREQUENCY (FRQ) y el complejo WHITE COLLAR (WC). En el caso de las plantas, el reloj molecular involucra elementos como TOC1 y CCA1 [1]. Si bien algunos organismos multicelulares como *Drosophila* y humanos poseen componentes homólogos (por ejemplo, las proteínas Periodo), sus funciones parecen ser diferentes entre los organismos [117–119]. Estos modelos de estudio sugieren que el sistema circadiano evolucionó independientemente dentro de diferentes linajes. No obstante, Edgar y colaboradores [111] estudiaron la hipótesis de que los relojes circadianos podrían tener un ancestro común.

Recientemente, mecanismos post-transcripcionales y post-traduccionales han ganado considerable atención no sólo por su importancia en modelos de retroalimentación [68, 74, 120], sino también por el descubrimiento de relojes no transcripcionales en varias especies. La principal evidencia de oscilaciones circadianas no transcripcionales fue publicada en el año 2005, cuando Kondo y colegas reconstituyeron un reloj molecular en un tubo de ensayo, compuesto solo por tres proteínas Kai provenientes de cianobacteria *Synechococcus elongatus*, suplementado con ATP como fuente de energía [110].

Unos años después, oscilaciones en los ciclos de reducción/oxidación de las proteínas peroxirredoxinas (PRX) altamente conservadas entre los dominios filogenéticos fueron evidenciadas en glóbulos rojos de humanos, en células de ratones y algas marinas [111, 116, 121], sugiriendo que las oscilaciones no transcripcionales podrían ser comunes en todos los sistemas circadianos. Estos hallazgos podrían reflejar un ritmo endógeno en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) [116]. Dado que todos los organismos vivos poseen PRX, Edgar y colaboradores proponen que este marcador de ritmos circadianos en metabolismo podría ser funcionalmente conservado entre los tres dominios filogenéticos [111]. De esta forma, los ciclos de 24 horas de reducción/oxidación de PRX observados en los dominios de vida (Bacteria, Archaea y Eucaria) podrían sugerir que los ritmos celulares comparten un origen molecular en común.

La pregunta a responder sería ¿porque la regulación redox estaría involucrada con el reloj molecular? Dado que el rol celular de las PRX principalmente involucra la remoción de subproductos metabólicos tóxicos, como ROS, se piensa que la habilidad para sobrevivir a los ciclos de estrés oxidativos podría haber contribuido a una ventaja selectiva desde los comienzos de la vida aeróbica aproximadamente 2.5 billones de años atrás en el tiempo del Gran Evento de Oxidación (GEO) (Ilustración 7). Las bacterias fotosintéticas adquirieron la capacidad de foto-disociar el agua, resultando en la acumulación geológicamente rápida de oxígeno molecular durante el día y la vida anaeróbica sufrió una catastrófica disminución [121–123]. Evidentemente, los organismos que sobrevivieron esta transición a un ambiente aeróbico fueron aquellos capaces de respirar oxígeno. Dado que la cadena de transporte de electrones involucra oxígeno inevitablemente produce aniones superóxido como subproductos, por ende, durante el GEO los organismos que lograron subsistir adquirieron sistemas de remoción de ROS o fueron relegados a nichos anaeróbicos [122].



1.2.5.1 Oscilaciones en los ciclos de reducción/oxidación de peroxirredoxinas

Las PRX son una familia de proteínas antioxidantes involucradas en el metabolismo y señalización del peróxido de hidrógeno. Estructuralmente, las PRX pertenecen al grupo de enzimas PRX 1-Cys o 2-Cys, de acuerdo a la cantidad de residuos conservados de cisteínas catalíticas en su secuencia [124]. En mamíferos, existen cinco PRX dentro del grupo PRX-2Cys (PRX 1-5) y sólo una en el grupo PRX 1-Cys (PRX6). Las PRX también puede ser clasificadas de acuerdo a su habilidad para formar puentes disulfuro inter o intra molecular dentro de los dímeros, denotada como típicas (PRX 1-4) o atípicas (PRX 5), respectivamente [124].

Su mecanismo catalítico (*Ilustración 8*) involucra la oxidación de una cisteína catalítica en el sitio activo de la enzima dando lugar a ácido sulfénico (Cys-SOH), el cual luego puede formar un puente disulfuro con otro residuo de cisteína no catalítico (resolución). En la mayoría de los organismos, el sistema tioredoxina completa el ciclo al reducir este puente disulfuro a expensas de la oxidación de una molécula de NADPH. Este loop catalítico tiene un rápido recambio y permite la manutención de bajos niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno.

El resto de la forma sulfénica de las proteínas PRXs (Cys-SOH) puede ser aún más oxidada en su cisteína catalítica dando lugar a las formas de ácido sulfínico y sulfónico (Cys-SO₂/₃H). Los residuos Cys-SO₂H pueden ser lentamente reciclados a través de la reducción dependiente de ATP de sulfiredoxina [125], mientras que una mayor oxidación a Cys-SO₃H (denominado hiperoxidación) se postula que es irreversible. La hiperoxidación de las cisteínas catalíticas estaría involucrado en la señalización del peróxido a través del intercambio de enlaces disulfuro y actividad de chaperona de los oligómeros hiperoxidados [124].

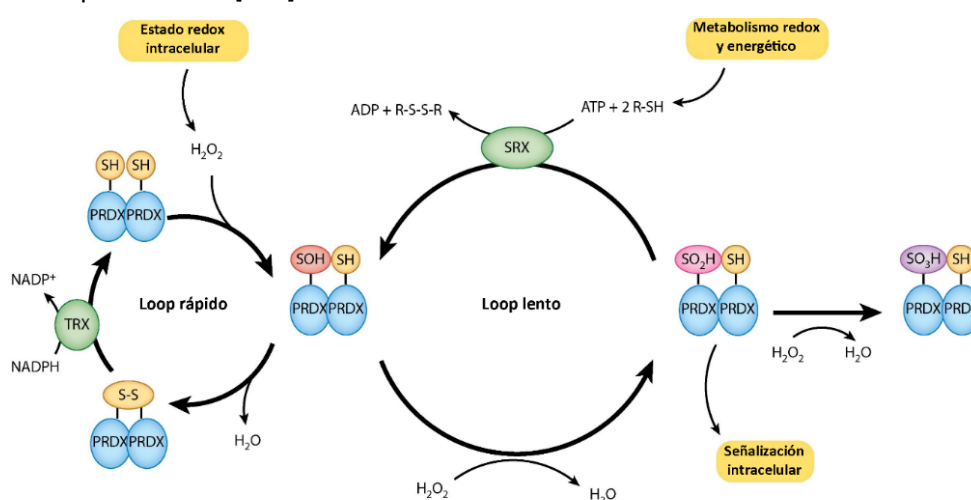


Ilustración 8: Sistema de PRX-2Cys. El mecanismo catalítico de las PRX-2Cys está compuesto por dos ciclos interconectados. En el primer ciclo, las PRX sufren peroxidación de su cisteína catalítica ubicada en el sitio activo de la enzima convirtiéndose en la forma de ácido sulfénico (Cys-SOH), seguido de la formación de un puente disulfuro con la cisteína vecina (resolución) y la etapa de reciclado catalizado por el sistema tioredoxina a expensas de la oxidación de una molécula de NADPH. El resto de la forma sulfénica de las proteínas PRXs (Cys-SOH) puede ser aún más oxidada a las formas de ácido sulfínico y

sulfónico (Cys-SO₂/₃H). De este modo ingresan al segundo ciclo en el cual los residuos Cys-SO₂H pueden ser lentamente reciclados a través de una reducción dependiente de ATP mediante el sistema sulfiredoxina [125]. En relación al recambio de cada ciclo, mediciones *in vitro* demostraron que el ciclo peroxidático (primer ciclo) es rápido [126] y permite mantener bajos niveles de peróxido de hidrógeno intracelulares, mientras que el segundo ciclo es mucho más lento [127].

Utilizando un anti suero contra el sitio activo de las PRX en su forma PRX-SO₂/₃, Edgar y colaboradores evidenciaron ritmos en varios modelos eucariotas en condiciones constantes, es decir, en ausencia de señales externas de sincronización. En ratones, demostraron que tanto la abundancia de las PRX-SO₂/₃ como la PRX1 total exhibían un ciclo diario en tejido hepático y también en el NSQ. Para extender estos hallazgos a otros modelos de estudio, oscilaciones circadianas en la abundancia de PRX-SO₂/₃ también fueron evidenciadas en la mosca *Drosophila melanogaster*, en plántulas de *Arabidopsis thaliana* y en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*. Sus hallazgos también se extendieron a organismos procariotas, demostrando ciclos de oxidación de PRX en cianobacterias y arqueas. Estas observaciones en procariotas evolutivamente diversos proveen pruebas convincentes de que la oxidación rítmica de las PRX es un marcador circadiano conservado a través de los dominios filogenéticos [111].

Por otra parte, O'Neill y Reddy evidenciaron ciclos redox de 24 h en las PRX en glóbulos rojos, sugiriendo que la transcripción no es requerida para estas oscilaciones circadianas. Más aún, estos ritmos pueden ser sincronizados por estímulos ambientales y compensados por temperatura, ambas características de los ritmos circadianos [116, 121].

De este modo, la profunda conservación filogenética de los ritmos redox de PRX se extiende a especies fúngicas, plantas, bacterias e incluso arqueas [111]. Tales ritmos no son dependientes de genes reloj, dado que mutantes que carecen componentes circadianos mantienen oscilaciones redox, aunque muestran ligeramente un cambio de fase. Por otro lado, en organismos deficientes para las enzimas PRX-2Cys, los ritmos circadianos persistieron con el periodo registrado en su contraparte *wild-type* aunque su fase o amplitud fueron significativamente alteradas respecto a los controles.

En resumen, estos hallazgos sugieren que los ritmos redox parecen ser componentes importantes de los ritmos biológicos y que el sistema de PRX podría formar parte del oscilador metabólico dada su amplia conservación filogenética. Con toda esta evidencia se podría postular que el reloj celular está conformado por el reloj transcripcional y el oscilador metabólico. En condiciones normales/fisiológicas ambos osciladores trabajan mancomunadamente.

1.3 METABOLISMO LIPÍDICO

Dado que una de las características metabólicas de células tumorales es la desregulación del metabolismo lipídico, considerar esta área de investigación es una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de cáncer en humanos. Estudios recientes muestran que la

reprogramación del metabolismo lipídico juega roles importantes al proveer energía, macromoléculas para la síntesis de membranas y señalización durante la progresión tumoral, mientras que la acumulación de gotas lipídicas en células tumorales actúa como respuesta adaptativa fundamental a condiciones dañinas. Las células tumorales proliferativas rápidamente incrementan sus demandas de energía y macromoléculas, y luego para hacer frente a estas grandes demandas, las células tumorales exacerbaban la utilización de la vía de glucólisis y consumo de glutamina [128, 129].

De este modo, la reprogramación del metabolismo lipídico juega un rol crítico en las patologías de malignidades humanas y asociadas a cáncer [130], por lo que conocer la regulación del metabolismo en células tumorales tiene importantes implicancias para explorar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de cáncer.

1.3.1 Glicerofosfolípidos

Los glicerofosfolípidos (GFLs) son los principales constituyentes de las bicapas de membranas de todas las células. Estas estructuras están constituidas por un esqueleto de tres carbonos de glicerol, dos ácidos grasos de cadena larga esterificados a grupos hidroxilos en los carbonos 1 y 2 (C1 y C2) del glicerol, y un grupo fosfato esterificando al grupo hidroxilo del C3 del glicerol, dando lugar al GPL más simple, el ácido fosfatídico (PA). La mayoría también tiene un grupo alcohol esterificado al fosfato. Los ácidos grasos poseen un grupo carboxilo en un extremo de su cadena alifática de 13 a 19 carbonos adicionales. Además de su función estructural en las membranas celulares, los GFLs también participan en sistemas de señalización celular y otras importantes funciones.

1.3.1.1 Síntesis *de novo* de glicerofosfolípidos

La composición de los GFLs es bastante diversa dependiendo del tipo celular, organelas y capas internas o externas de las membranas celulares. Los grupos acilo de los GFLs sintetizados en la vía *de novo* son subsecuentemente remodelados por la acción de fosfolipasas y lisofosfolípidos aciltransferasas. Este remodelado también contribuye a la generación de diversidad de GFLs en las membranas y a la producción de mediadores lipídicos como ácidos grasos derivados de lisofosfolípidos.

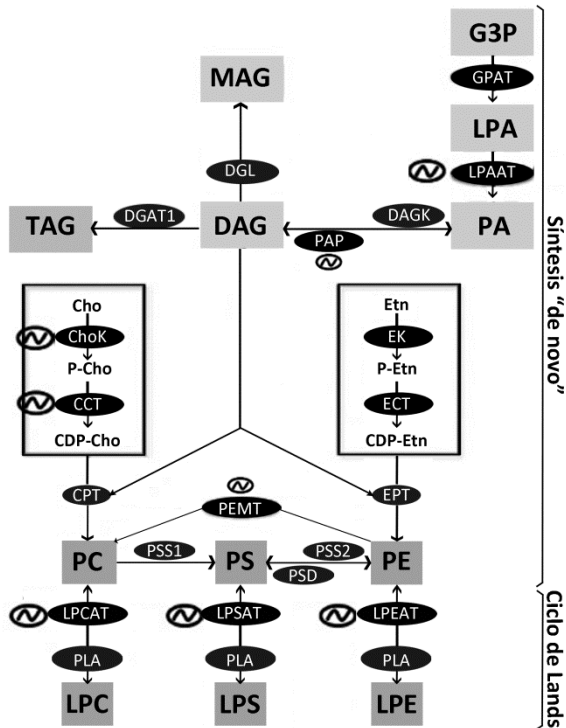
La síntesis *de novo* de GFLs puede observarse en la Ilustración 9. A partir de la acilación consecutiva del glicerol-3-fosfato (G3P) en C1 y C2 se produce el ácido lisofosfatídico (LPA) y ácido fosfatídico (PA), respectivamente [131]. Estos dos pasos resultan comunes para todos los GFLs y están catalizados por las enzimas denominadas acil-CoA: glicerol-3-fosfato (GPAT) y ácido lisofosfatídico aciltransferasa (LPAAT) [132–134]. El PA formado en el paso anterior puede ser desfosforilado por la acción de enzimas con actividad fosfatasa (PAP-1) dando lugar al diacilglicerol (DAG) para sintetizar GFLs (fosfatidilcolina, PC; fosfatidiletanolamina, PE) o triacilglicerol (TAG) [133–135].

Lo que respecta a los GLPs, la PC y PE representan más del 50% del total de GLs en membranas eucariotas cumpliendo importantes roles estructurales y funcionales. En 1956, Kennedy y Weiss [136] elucidaron la biosíntesis de *novo* de PC y PE a partir de hígado de rata como fuente de enzima. Las ramas de la vía de Kennedy para la síntesis de PC y PE se basan en la formación de intermediarios característicos de alta energía: CDP-etanolamina y CDP-colina para la síntesis de PE y PC, respectivamente. En consecuencia, estas dos ramas de la vía de Kennedy son usualmente nombradas como las vías CDP-etanolamina y CDP-colina, respectivamente.

La vía CDP-etanolamina consiste en 3 pasos enzimáticos. Inicialmente, la enzima etanolamina quinasa (EK) cataliza la fosforilación de la etanolamina dependiente de ATP, formando fosfoetanolamina (P-Etn) y ADP como subproducto. En el segundo paso, el cual es considerado limitante en la vía de Kennedy, la enzima CTP-fosfoetanolamina citidiltransferasa (ECT) usa la P-Etn y CTP para formar un donante de alta energía CDP-etanolamina (CDP-Etn) con la liberación de pirofosfato. Cabe destacar que la enzima ECT ha sido implicada en numerosos procesos que involucran la homeostasis de PE, y su desregulación puede llevar al desarrollo de obesidad, resistencia a insulina, esteatosis hepática y dislipidemia [137]. El gen que codifica para la enzima ECT, *Pcyt-2*, estaría involucrado en la regulación del crecimiento celular y homeostasis metabólica, y podría regular el balance entre la supervivencia de células cancerígenas, su invasividad y metabolismo energético [137, 138].

Por último, la enzima CDP-etanolamina 1,2 diacilglicerol etanolamina fosfotransferasa (EPT) cataliza la reacción final usando CDP-Etn y DAG como esqueleto lipídico nombrado anteriormente para formar PE y CMP como subproducto. La vía análoga para la síntesis de PC involucra la rama CDP-colina (CDP-Cho) de la vía de Kennedy, que utiliza una serie de reacciones similares, excepto por el uso de colina en vez de etanolamina para sintetizar PC.

Ilustración 9: Esquema de la biosíntesis *de novo* y remodelado de GFLs en mamíferos. Los GFLs son sintetizados *de novo* principalmente a través de la vía de Kennedy y luego son remodelados dentro del ciclo de Lands mediante aciltransferasas específicas. Los pasos marcados con el símbolo ~ indican una variación temporal significativa. Tomado de Acosta-Rodriguez [139].



Abreviaciones: G3P (glicerol-3-fosfato); LPA (ácido lisofosfátidico); LPC (lisofosfatidilcolina); LPS (lisofosfatidilserina); LPE (lisofosfatidiletanolamina); DAG (diacilglicerol); PA (ácido fosfatídico); PC (fosfatidilcolina); PE (fosfatidiletanolamina), Etn (etanolamina), CDP-Etn (citidinafosfato-etanolamina), Cho (colina), P-Cho (fosfocolina), CDP-Cho (citidinafosfato-colina); GPAT (glicerol-3-fosfato aciltransferasa), CCT (CTP:fosfocolina citidiltransferasa), LPAAT (ácido lisofosfátidico aciltransferasa), DAGK (diacilglicerol quinasa), PAP (fosfatidato fosfohidrolasa), ChoK (colina quinasa), CPT (CDP-colina:diacilglicerol colinafosfotransferasa), EK (etanolamina quinasa), ET (CTP:fosfoetanolamina citidiltransferasa), EPT (CDP-etanolamina:diacilglicerol etanolaminafosfotransferasa), PEMT (Fosfatidiletanolamina metil transferasa), PSD (fosfatidilserina descarboxilasa), PSS1 (fosfatidilserina sintasa).

Las enzimas de la vía de Kennedy comparten un rango de sustratos; por ejemplo, varias isoformas de la enzima colina quinasa (ChoK) en mamíferos son capaces de fosforilar el sustrato etanolamina [140] y algunas fosfotransferasas pueden usar tanto CDP-Cho como CDP-Etn para sintetizar PC y PE [141–143]. En cambio, las enzimas CTP-fosfocolina citidiltransferasa (CCT) y ECT son altamente específicas para la fosfocolina y fosfoetanolamina, respectivamente, y catalizan el paso regulatorio de la vía de Kennedy [140, 141].

1.3.2 Gotas lipídicas

Las gotas lipídicas (GLs) o LDs (*lipid droplet*, por sus siglas en inglés) son pequeñas organelas citoplasmáticas y sumamente dinámicas, cuyo número y tamaño varía significativamente entre los distintos tipos celulares; usualmente es cercano a 1µm y raramente mayor a 10 µm [144, 145]. Estas estructuras están compuestas por un centro de lípidos neutros rodeado de una monocapa de fosfolípidos y proteínas específicas unidas a su superficie. Para prevenir la coalescencia de las GLs, las células recubren el centro hidrofóbico de las mismas con una monocapa de fosfolípidos [144] los cuales actúan como surfactantes y estabilizan las partículas dispersas. En particular, la PC tiene un rol clave en la biología de GLs debido a su habilidad para reducir la tensión superficial [146]. Es así que, los genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de GFLs son determinantes en el tamaño y número de GLs, sugiriendo que la composición de GFLs de la monocapa afecta profundamente su morfología y utilización de lípidos.

La síntesis de lípidos neutros en el retículo endoplásmico (RE) por enzimas como diglicérido aciltransferasa 1 (DGAT1) conlleva a la formación de GLs nascentes [147, 148]. Luego de su formación, las GLs pueden continuar creciendo por síntesis local de lípidos neutros o, en ciertos tejidos especializados como adipocitos, por fusión [147, 149]. En condiciones de excesiva energía metabólica (por ejemplo, exceso de ácidos grasos), las células forman GLs, y algunas de ellas pueden crecer dramáticamente (más de 30 veces su volumen en h) [146]. Las GLs de gran tamaño pueden formarse por dos mecanismos. Uno de ellos es la fusión o coalescencia de GLs, lo cual es relativamente raro en condiciones normales [150], pero ocurre frecuentemente en deficiencia de PC o acumulación de PA [151, 152]. El otro mecanismo es por crecimiento o expansión; en GLs en crecimiento, los TAG son adicionados al núcleo y los GFLs a la superficie. Kraemer y colaboradores describieron un mecanismo por el cual la síntesis de PC se activa para mantener suficiente PC en la superficie de GLs. Si bien los TAG son sintetizados en el RE, se desconoce cómo son adicionados a los núcleos de GLs [146].

Ante la falta de energía, los lípidos neutros almacenados en GLs pueden ser degradados por dos vías: lipólisis o lipofagia [153]. La lipólisis es mediada vía lipasas asociadas a GLs como la adiposo triglicérido lipasa (ATGL) mientras que la lipofagia involucra a la enzima lipasa de ácido lisosomal (LAL) actuando sobre GLs en autolisosomas vía autofagia. Los ácidos grasos provenientes de lípidos neutros pueden ser usados para producción de energía vía oxidación mitocondrial o peroxisomal [154, 155]. Las GLs responden por lo tanto al balance celular entre lipogénesis y lipólisis jugando un rol clave en la homeostasis energética. Esta homeostasis es crítica para la funcionalidad normal de la célula y se encuentra alterada en varias patologías humanas incluyendo obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares e hígado graso [156].

1.3.3 Implicancias del sistema circadiano en el metabolismo lipídico

El sistema circadiano juega un rol clave en la regulación del metabolismo lipídico, favoreciendo los ritmos diarios de absorción de lípidos, almacenamiento y transporte que son temporalmente coordinados con los ciclos de actividad/descanso y alimentación/ayuno. A nivel celular, los genes involucrados en la síntesis de lípidos y oxidación de ácidos grasos son rítmicamente activados y reprimidos por proteínas del reloj molecular específicas de cada tejido. En consecuencia, la pérdida de función de los genes reloj o desequilibrio de los ritmos circadianos con los ciclos de alimentación resulta en deterioro de la homeostasis lipídica [22].

Distintos estudios demuestran que un gran conjunto de sitios de unión a ADN es rítmicamente ocupado por BMAL1, incluyendo genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, regulación transcripcional y ciclo celular [157, 158]. Un claro ejemplo del vínculo entre la regulación circadiana y el metabolismo de lípidos, son los genes reloj *Rev-erba/β* que codifican para receptores nucleares involucrados en la represión de genes metabólicos. Los sitios de ocupación en el genoma de

estos receptores nucleares han evidenciado el reclutamiento del complejo constituido por el co-represor (NcoR) y la histona deacetilasa 3 (HDAC3) para reprimir la transcripción de *Bmal1* y otros genes con elementos *RORE* en sus promotores. El conjunto de sitios de unión al ADN de REV-ERB α , NcoR y HDAC3 muestran una extensiva superposición y están enriquecidos en genes involucrados en el metabolismo de lípidos [56, 159, 160].

Estos hallazgos fueron confirmados y extendidos en un estudio que examina el ritmo circadiano en la ocupación del genoma para siete de las proteínas reloj en el hígado de ratón (BMAL1, CLOCK, NPAS2, PER1, PER2, CRY1, and CRY2) [161]. En conjunto, estos estudios demuestran que el reloj molecular regula vías metabólicas de lípidos al activar o reprimir genes involucrados en el metabolismo lipídico, tanto de forma directa o regulando el ciclo de otros factores de transcripción.

1.3.4 Pérdida de función de genes reloj asociado a disfunciones metabólicas.

El rol funcional del reloj molecular en el metabolismo lipídico ha sido estudiado usando ratones *knockout* (KO) o mutantes para los genes reloj. Un ejemplo de estos estudios son los ratones mutantes *Clock* Δ 19 arrítmicos en su comportamiento que presentan hiperfagia y desarrollan obesidad, acompañado de hiperglucemia, hiperlipidemia y esteatosis hepática [162], representando un modelo animal de “síndrome metabólico”. Los ratones KO de *Bmal1* desarrollan artropatía no inflamatoria en la edad adulta [163] resultando en progresiva pérdida de peso, actividad reducida y menor ingesta de agua y comida. De manera similar al mutante *Clock*, los ratones con pérdida de función de BMAL1 presentan comportamiento arrítmico, exhiben hiperlipidemia y experimentan un envejecimiento adelantado [164, 165].

Los componentes represores del reloj molecular también han sido implicados en disfunciones metabólicas. Es así, que ratones deficientes de PER2 muestran una marcada reducción en triglicéridos circulantes y ácidos grasos no esterificados [69]. Por otra parte, los ratones con pérdida de ambas proteínas CRY exhiben intolerancia a la glucosa y constitutivamente altos niveles de corticosterona circulante, el principal glucocorticoide en roedores [166].

1.4 RITMOS BIOLÓGICOS Y CÁNCER

La carcinogénesis es un proceso complejo que resulta en la acumulación de alteraciones genéticas primariamente en genes involucrados en la regulación de vías de señalización relevantes para el control del crecimiento y división celular. Entre las características típicas de los procesos neoplásicos se encuentran la activación exacerbada de una proliferación sostenida, evasión de supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, y capacidad de invasión y metástasis. A esto se le suma la inestabilidad genética que facilita los procesos inflamatorios, la reprogramación del metabolismo energético y la evasión del sistema inmune [167].

En cuanto a los tumores del sistema nervioso, los gliomas de alto grado son los tumores cerebrales primarios más frecuentes, extremadamente agresivos e invasivos. Luego del diagnóstico de pacientes con glioblastoma (GBM), la sobrevida del mismo es de aproximadamente 12-14 meses siguiendo el protocolo terapéutico denominado *Stupp*. Esta estrategia, en caso de ser posible, consta de la remoción quirúrgica de la masa tumoral seguida de radioterapia y quimioterapia con Temozolomida (TMZ). Sin embargo, debido a la capacidad infiltrante de este tumor, generalmente no es posible asegurar la eliminación total de la masa tumoral. La TMZ es un agente alquilante oral que ha demostrado actividad antitumoral en el tratamiento recurrente de gliomas [168–170]. El esquema convencional aprobado es una dosis diaria de 150-200 mg por m² del área del cuerpo durante 5 días de cada ciclo de 28 días.

Considerando la gran vascularización de este tipo de tumor, muchos estudios se han focalizado en la aplicación de terapias anti-angiogénicas [171]. Sin embargo, se han reportado resultados negativos en ensayos clínicos en pacientes con GBM utilizando *Bevacizumab* cuyo blanco es el factor de crecimiento endotelial vascular [172, 173]. En contraste con estos resultados, la coadministración de radioterapia (RT) y TMZ casi ha triplicado la sobrevida de 2 años en pacientes con GBM en la última década obteniéndose un 10% cuando el tratamiento sólo era RT y 27% de sobrevida con la combinación de RT y TMZ. En paralelo, a los pacientes se los trata con dexametasona para disminuir la neuroinflamación. Es de destacar, que en la clínica en etapas avanzadas o terminales del tratamiento de GBM se ha comenzado a utilizar otro agente quimioterapéutico denominado Bortezomib que actúa inhibiendo la actividad proteosomal.

La notable heterogeneidad inter-tumoral a nivel molecular y celular [174] habitualmente se traduce en distintas respuestas clínicas frente a los tratamientos convencionales, resaltando la importancia del desarrollo de terapias personalizadas y nuevos enfoques quimioterapéuticos. En la actualidad, la efectividad de los tratamientos antineoplásicos ha mejorado en gran parte gracias a la mayor comprensión de las bases moleculares y celulares del cáncer. Es así, que entender la biología de los tumores y entre ellos los de cerebro como es el caso de GBM, sirve de base para el diseño racional de nuevos abordajes terapéuticos [169, 173, 175].

1.4.1 Implicancias de la disrupción del sistema circadiano en el desarrollo de cáncer

El reloj central y los osciladores periféricos regulan coordinadamente la expresión rítmica de genes específicos de cada tejido a fin de acoplar diversos procesos fisiológicos y comportamentales a los cambios periódicos en el ambiente. Sin embargo, en el mundo industrializado en el que vivimos, se han incrementado las actividades que alteran la homeostasis endógena con señales circadianas externas. La vida moderna se caracteriza por el aumento de las actividades nocturnas con prolongada iluminación artificial, por ejemplo, el trabajo con turnos rotativos, modificación del horario de

alimentación y dietas hipercalóricas, alteración y privación del sueño. En consecuencia, la **disrupción circadiana** ha surgido como un nuevo concepto, caracterizándose por una pérdida en la correcta coordinación entre los diferentes componentes del sistema circadiano (disminución en la amplitud de la oscilación, modificación de los picos de actividad o duración del ciclo) [176]. Este desequilibrio es considerado un factor contribuyente al desarrollo de cáncer, síndrome metabólico, obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares y desordenes inflamatorios [177–181].

Tanto estudios epidemiológicos como modelos animales han revelado que el desarrollo del cáncer está estrechamente asociado con la pérdida de la homeostasis circadiana en el balance energético, función inmune y envejecimiento. El reloj circadiano controla estas funciones celulares tanto localmente en las células de los tejidos periféricos como a nivel de organismo a través de vías de señalización extracelular. De esta manera, la jerarquía del reloj circadiano en mamíferos provee un sistema único para estudiar carcinogénesis como un proceso fisiológico desregulado *in vivo*. El desequilibrio entre el huésped y los tejidos malignos en proliferación celular y metabolismo también provee nuevas opciones para novedosas terapias antitumorales.

La relación entre la disrupción circadiana y una mayor susceptibilidad al desarrollo de cáncer, ha sido observada en cáncer de mama, ovario, pulmón, páncreas, próstata, colorrectal y de endometrio, linfoma non-Hodgkin, osteosarcoma, leucemia mieloide aguda, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y carcinoma hepatocelular [182, 183, 192–197, 184–191].

En base a estos hallazgos, en 2007 la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasificó al “trabajo rotativo que involucra una disrupción en los ritmos circadianos” como un probable carcinógeno humano, clasificado en el grupo 2A [198]. La disrupción circadiana se ve influenciada por el número de años, la frecuencia de los esquemas de trabajo rotativo y el número de horas por semana de trabajo a la noche en los trabajadores de turnos nocturnos [193, 194, 199–201]. Un estudio realizado con enfermeras en Noruega reveló que las mujeres que trabajaron durante la noche por menos de 30 años presentan un riesgo moderadamente incrementado a desarrollar cáncer de mama. Este riesgo aumenta aún más en enfermeras que trabajaron 30 o más años con turnos rotativos [199, 202, 203]. De manera similar, se ha reportado que el riesgo de cáncer de próstata está incrementado en trabajadores rotativos nocturnos, y este riesgo aumenta conforme a una mayor duración del trabajo rotativo, especialmente en cáncer de alto grado [204, 205].

En relación a los mecanismos de desregulación de los genes reloj en cáncer en humanos se ha evidenciado el silenciamiento epigenético por metilación del promotor, desregulación a nivel transcripcional o post-transcripcional y variaciones estructurales de proteínas reloj debido al polimorfismo de genes. En el caso de los genes *Per*, presentan frecuentemente una expresión disminuida y distintos polimorfismos en cáncer de mama, endometrio, próstata, páncreas, colorrectal

y células no pequeñas de pulmón, como también en carcinoma hepatocelular, carcinoma escamoso de cuello, gliomas y linfoma mieloide crónica [206, 207, 216, 208–215]. Por otra parte, la sobreexpresión de *Per1* y *Per2* sensibiliza a las células cancerosas humanas a la muerte celular mediada por apoptosis inducida por daño al ADN [217–219]. Estos estudios muestran que una alta expresión de *Per1* y *Per2* puede promover apoptosis en células tumorales, sugiriendo que los genes *Per* podrían actuar como supresores tumorales. Otros estudios demuestran que la inactivación epigenética de *Bmal1* está relacionada a malignidades hematológicas mientras que polimorfismos en genes *Clock* y *Cry1/2* se encuentran frecuentemente asociados a un incremento en el riesgo o recurrencia de Linfoma de non-Hodgkin, leucemia mieloide aguda, cáncer de ovario endometrial, colorrectal y de mama [220–225].

Los modelos experimentales en animales mutantes para los genes reloj y diversos estudios moleculares han permitido evidenciar los vínculos emergentes entre la disrupción circadiana, su influencia en el cáncer y en desordenes metabólicos. En la siguiente Tabla, se ejemplifican algunos de los estudios nombrados:

Tabla 2: Mutaciones en genes reloj y defectos metabólicos o relacionados a cáncer

Gen reloj mutado	Defectos metabólicos	Defectos relacionados a cáncer
<i>Clock</i>	Síndrome metabólico [162]	Envejecimiento prematuro luego de irradiación [226]
<i>Bmal1</i>	Intolerancia a la glucosa, hipoinsulinemia, aumento de la hipoglucemia inducida por insulina, hiperlipidemia [163, 164, 226, 227]	Ratones <i>Bmal1</i> ^{+/-} presentan una mayor tasa de neoplasia espontánea e inducida por radiación [229]
<i>Cry1</i> y <i>Cry2</i>	Intolerancia a la glucosa, aumento de corticosterona circulante [166]	Retraso en el desarrollo de cáncer en ratones <i>Trp53</i> ^{-/-} [230].
<i>Per1</i> y <i>Per2</i>	Intolerancia a la glucosa [227]	Ratones deficientes en PER2 presentan un incremento en la sensibilidad a irradiación y e hiperplasia en glándula salival [217].
<i>Rev-erba</i>	Aumento de triglicéridos séricos [231]	

1.4.2 Cronoterapia

Las múltiples conexiones evidenciadas entre el desequilibrio del sistema circadiano y una mayor incidencia de cáncer generan interés en preguntarnos si la intervención terapéutica en

determinados momentos del día debería comenzar a considerarse en los tratamientos quimioterapéuticos.

La cronoterapia es la ciencia que estudia la prevención o tratamiento de enfermedades de acuerdo a los ritmos biológicos [232]. Esto involucra el momento de intervenciones farmacológicas y no farmacológicas, como la cirugía, agentes físicos y psicoterapia. El objetivo es minimizar la toxicidad o efectos adversos, y/o mejorar la eficacia a través de un tratamiento adecuado en tiempo y forma [233, 234]. En este sentido, el enfoque cronobiológico ha mejorado la tolerancia y eficacia de drogas antitumorales tanto en modelos experimentales como en pacientes con cáncer [235–237].

Diversos estudios muestran una fuerte evidencia de que enzimas metabólicas y la detoxificación de xenobióticos exhiben picos temporales en su actividad y podrían ser blancos farmacológicos usados para optimizar los tratamientos quimioterapéuticos. En relación a esto, se ha reportado que la enzima acetil-CoA sintetasa (ACSS2) sufre a los tumores de acetil-CoA dependiente de acetato que es usado para la lipogénesis de *novo* y la acetilación de histonas [238, 239]. A su vez, la actividad de tal enzima es modulada por SIRT1 dependiente de NAD⁺. Como fue discutido anteriormente, el heterodímero CLOCK: BMAL1 controlada a nivel transcripcional la expresión de la enzima limitante en la biosíntesis de NAD⁺. De este modo, un enfoque cronobiológico podría considerar los cambios en la actividad de ACSS2 regulados por el reloj para potenciar su efecto sobre el crecimiento de células tumorales. Evidencias recientes también sugieren que agonistas farmacológicos de los componentes REV-ERB son selectivamente letales en células cancerosas perjudicando el crecimiento de GBM *in vivo* [240]. Estos hallazgos requieren de mayor examinación para determinar si este tipo de enfoque podría ser efectivo en otros tipos de cáncer.

En lo que respecta a ensayos clínicos en fase III, se ha reportado que tratamientos con esquemas de cronoterapias han resultado en una tolerancia 5 veces mayor y el doble de eficacia comparado con tratamientos convencionales que no tienen en cuenta el momento de la administración [241]. No obstante, resultados experimentales y clínicos han evidenciado amplias diferencias entre los individuos, lo cual se traduce en diferentes perfiles de cronotoxicidad [242, 243]. Tales diferencias pueden deberse a cambios epigenéticos, sexo, edad, estilo de vida, enfermedades o tratamientos farmacológicos [244–247].

Irinotecan, un ejemplo de las drogas estudiadas, es un inhibidor de la enzima topoisomerasa usado en malignidades gastrointestinales y colorrectales. Distintos parámetros como la farmacocinética, farmacodinámica, toxicidad y eficacia de esta droga exhiben ritmos circadianos en células sincronizadas en cultivo, en ratones y en pacientes con cáncer [248, 249]. Un estudio realizado con Irinotecan evaluó 31 pacientes con cáncer, los cuales recibieron la droga de manera convencional en una infusión de 30 min en la mañana o como infusión cronomodulada desde las 2am a 8am. Los

pacientes que recibieron la administración cronomodulada, sufrieron menos diarrea y menor variabilidad entre los pacientes comparado con la terapia convencional [250].

Por otro lado, un estudio en fase III con 186 pacientes con cáncer colorrectal metastático analiza la administración cronomodulada de oxaliplatino, 5-FU y ácido folínico en comparación con el método convencional. La administración cronomodulada disminuyó 5 veces la toxicidad en mucosas comparado con la administración constante de la droga (14% vs 76%) y redujo a la mitad el deterioro funcional de la neuropatía periférica (16% vs 31%) [251]. Recientemente, una alta expresión de *Bmal1* ha sido relacionada con un incremento en la eficacia de la quimioterapia basada en oxaliplatino contra este tipo de cáncer [252].

Estas evidencias sugieren que la administración de terapias de acuerdo a las variaciones circadianas muestra avances beneficiosos en estudios clínicos con pacientes con cáncer. Debido a las variabilidades inter e intra- pacientes observadas, es necesario la integración de parámetros claves específicos del paciente para el diseño de farmacoterapias personalizadas.

1.5 ANTECEDENTES DE RITMOS CIRCADIANOS, METABOLISMO Y CÁNCER

Como se ha discutido en las secciones anteriores, el advenimiento de la modernidad y la industrialización (luz artificial, dietas hipercalóricas, vuelos transmeridianos, trabajo nocturno con turnos rotativos) ha provocado la pérdida de sincronía entre los procesos internos de nuestro organismo y el ambiente que nos rodea, lo que se denomina **disrupción circadiana**. Este fenómeno ha sido vinculado con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer y desordenes metabólicos. Sin embargo, poco se conoce sobre la regulación circadiana del metabolismo de células tumorales que proliferan de manera exacerbada.

A lo largo de los años, nuestro laboratorio ha sido pionero en el estudio de las variaciones temporales en los niveles de GFLs y los perfiles temporales de la actividad y expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de los mismos en diferentes modelos de estudio. Entre ellos, se demostró que la síntesis de fosfolípidos y melatonina oscila en forma rítmica en retina de pollo [39, 253, 254] y que fibroblastos NIH3T3 sincronizados con un *shock* de suero exhiben un patrón rítmico en las actividades de las enzimas LPAAT y PAP-1 que catalizan eventos tempranos en la síntesis *de novo* de GFLs. A su vez, se observó que el perfil de actividad de PAP-1 se correlaciona con los cambios diarios en la síntesis *de novo* de GFLs previamente descritos en el laboratorio [139]. Por último, se evidenció que las membranas celulares del hígado de ratón cambian su composición fosfolipídica de manera circadiana [255], como así también la expresión de varios genes reloj y GCR que codifican para enzimas particulares del metabolismo lipídico.

Recientemente, se analizó la expresión del ARNm de genes reloj y GCR en células de glioblastoma sincronizadas con un *shock* de dexametasona (DEX) en condición de arresto parcial o

proliferación. Los resultados evidenciaron variaciones temporales significativas en la expresión de ARNm de los genes reloj (*Per1*, *Rev-erb*) y GCR (*Pcyt-2*, *CKα*) en la condición de arresto parcial, mientras que en proliferación tales oscilaciones se perdían. En cambio, los resultados para la marcación metabólica de ³²P-GFLs en estas células evidenciaron oscilaciones circadianas en ambas condiciones de cultivo, sugiriendo que oscilaciones metabólicas podrían persistir aun cuando los perfiles de expresión de genes reloj se encuentren alterados.

Considerando estos resultados nos surge el siguiente interrogatorio: **¿Existe un oscilador metabólico funcional que pueda ayudar a controlar los ritmos de células tumorales incluso cuando el reloj molecular se encuentre alterado en condiciones proliferativas?**

Nuestra hipótesis se sustenta en publicaciones recientes que postulan la existencia de un reloj redox/metabólico responsable de los ciclos de oxidación de las PRX que regulan los niveles endógenos de peróxidos, funcionando incluso en ausencia de transcripción como ocurre por ejemplo en células enucleadas como los glóbulos rojos. Dicho oscilador metabólico se encuentra altamente conservado a través de la evolución, y presente en todos los dominios de vida desde bacterias hasta el hombre [111, 121].

En resumen, en los siguientes capítulos abordaremos el estudio de la regulación circadiana del metabolismo de células de glioblastoma en cultivo y evaluar si es posible determinar parámetros metabólicos que permitan maximizar la eficiencia de drogas antitumorales en determinados momentos del día. Para ello, evaluamos el estado metabólico de las células T98G de glioblastoma en cultivo a distintos horarios luego de ser sincronizadas y en células que tienen alterada la expresión del activador transcripcional *Bmal1*. Estos resultados nos permitirán inferir en la presencia y funcionalidad de un oscilador metabólico en células tumorales y su relación con el reloj molecular. Posteriormente, nos trasladamos a estudios *in vivo* utilizando células tumorales provenientes del sistema nervioso periférico de tipo glial y melanoma capaces de generar tumores al ser inyectadas en ratones C57BL/6. El objetivo de estos estudios es tratar de dilucidar el rol que cumple el sistema circadiano del huésped en relación al crecimiento y progresión tumoral. A continuación, se menciona el objetivo general y los objetivos específicos planteados en la presente tesis.

1.6 OBJETIVO GENERAL:

Investigar el funcionamiento del reloj circadiano en la regulación del metabolismo de células tumorales mediante estudios en líneas celulares sincronizadas en cultivo y en tumores generados *in vivo*.

El capítulo III de la presente tesis, abarca el estudio de las oscilaciones metabólicas y susceptibilidad a drogas antitumorales en células T98G en cultivo, para el cual se plantearon los siguientes objetivos específicos:

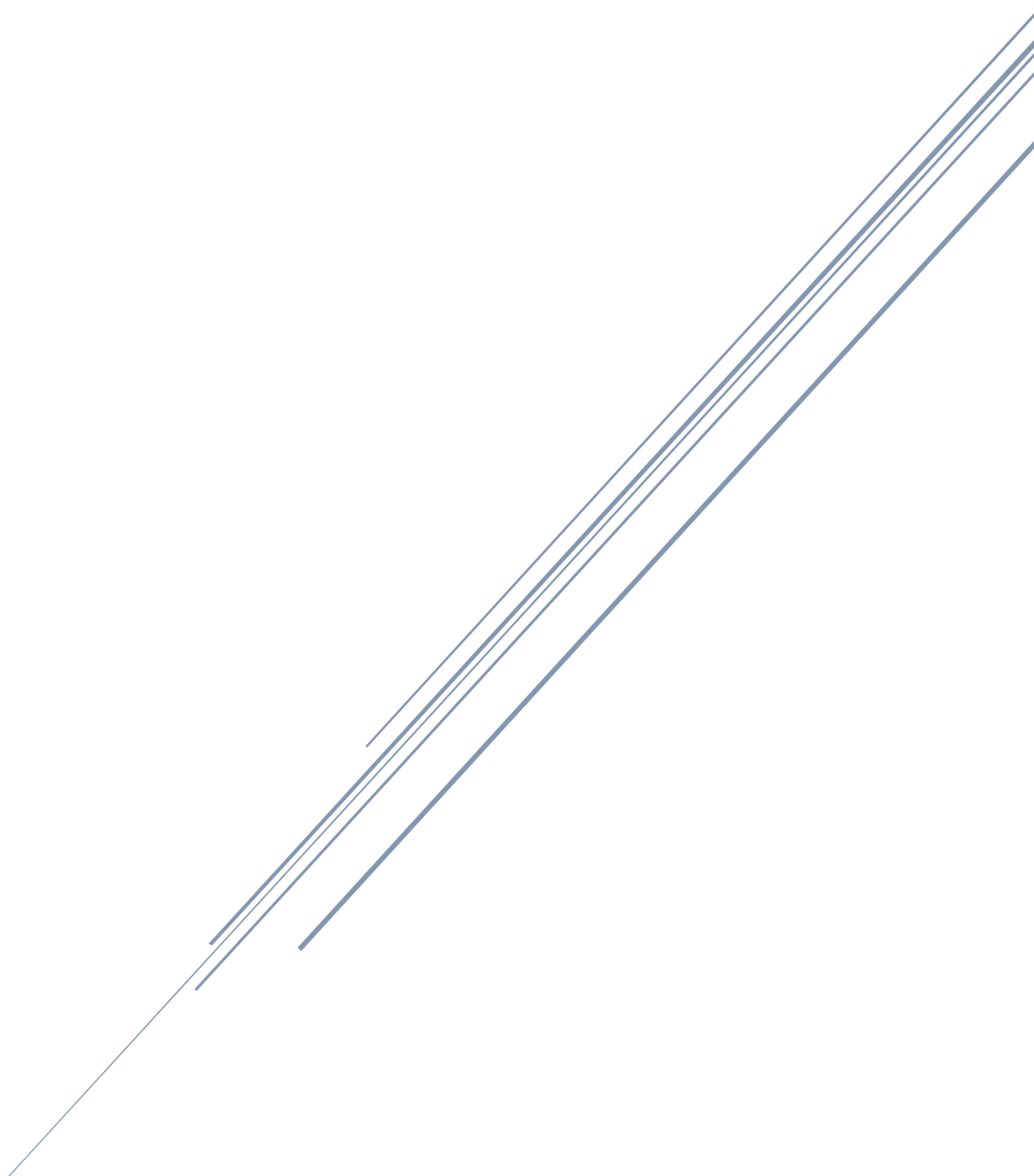
- Estudiar el metabolismo de células T98G sincronizadas y el estado redox en células silenciadas para el activador molecular *Bmal1*.
- Evaluar la susceptibilidad a drogas antitumorales (Bortezomib y SR9009) en función del estado metabólico y del reloj molecular.

En una segunda instancia, el capítulo IV abarca la caracterización de las células A530 en cultivo y estudios *in vivo*, para el cual se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar las células A530 en cultivo en función de sus proteínas reloj, estado redox y susceptibilidad al quimioterapéutico Bortezomib.
- Analizar la velocidad de crecimiento de tumores generados en ratones C57BL/6 mediante la inyección de células tumorales A530 de sistema nervioso periférico y B16 de melanoma a distintos horarios (día vs noche).
- Analizar la velocidad de crecimiento de tumores generados en ratones C57BL/6 mediante la inyección de células A530 que poseen alterada la expresión de *Bmal1* (A530 A5) en comparación con su grupo control.
- Evaluar el efecto del quimioterapéutico Bortezomib a distintos horarios (día vs noche) en tumores generados a partir de la inyección de células A530 en ratones C57BL/6.

CAPITULO II

Materiales y Métodos



CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 CULTIVO Y REPIQUE DE CÉLULAS

2.1.1 Células T98G

Las células T98G (ATCC, Cat #CRI-1690) provenientes de glioblastoma multiforme humano fueron cultivadas en medio DMEM (*Dulbecco modified Eagles medium*, Gibco) suplementadas con 10% de suero fetal bovino (SFB) de acuerdo a Portal y colaboradores [256] y mantenidas en estufa con 5% de CO₂ a 37°C.

Los repiques de las células se realizaron a partir de cultivos al 80-90% de confluencia. En primer lugar, se aspiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con 1 ml de PBS 1X. Luego, se adicionaron 500 µl de tripsina (0.25% en EDTA) durante 5 min a 37°C a fin de despegar las células adheridas a la placa. La tripsina se neutralizó con 1.5 ml de medio de cultivo y las células fueron centrifugadas durante 5 min a 1500 rpm. El pellet de células fue resuspendido en 1 ml de medio suplementado con 10% SFB y se sembraron diferentes alícuotas dependiendo del experimento planificado.

2.1.2 Células A530

Las células A530 fueron aisladas a partir de tumores malignos de la vaina del nervio periférico de ratones NPcis (*Nf1^{+/-} Trp53^{+/-}*, *The Jackson Laboratory*) por la Dra. Fabiola Velázquez del Laboratorio de la Dra. Beatriz Caputto (CIQUIBIC – CONICET) con quienes mantenemos colaboración. Los ratones NPcis contienen una mutación KO en los genes supresores *Trp53* (p53) y *Nf1* en la misma copia del cromosoma 11 (en “cis”). La copia restante de estos genes en el cromosoma 11 opuesta es WT. Dado que todas las células de los ratones NPcis son mutantes para una copia de los genes *Nf1* y *Trp53*, existe una alta probabilidad de la pérdida espontánea de las copias WT de ambos genes y en consecuencia los ratones presentan una alta probabilidad para desarrollar tumores dando lugar a astrocitomas malignos y glioblastomas [257, 258]. Tales células tienen la capacidad de crecer en suspensión sin inhibición por contacto, además de formar esferas y acúmulos típicos de células malignas.

Las células A530 fueron cultivadas en estufa a 37°C con 5% de CO₂ en medio DMEM (*Dulbecco modified Eagles medium*, Gibco) bajo en glucosa y medio Neurobasal (Gibco) en una proporción 5:3, respectivamente. Además, el medio de cultivo fue suplementado con 20% de SFB (Gibco), FGF (*Fibroblast Growth Factor* - 20 ng/ml, Life Technologies), EGF (*Epidermal Growth Factor* - 20 ng/ml, Sigma), suplemento B27 (Life Technologies), β-mercaptoetanol (55 µM) y ácido retinoico (0.12 µM).

2.1.3 Células B16

Las células B16 provenientes de melanoma murino fueron cultivadas en medio DMEM (*Dulbecco modified Eagles medium*, Gibco) suplementadas con 10% de SFB y mantenidas en estufa con 5% de CO₂ a 37°C. Los repiques de estas células se realizaron de igual manera que las células T98G como fue descrito anteriormente.

2.2 CONTROL DE CONTAMINACIÓN POR MICOPLASMA

Los cultivos celulares fueron controlados periódicamente mediante tinciones con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para corroborar la ausencia de contaminación por micoplasma. Brevemente, las células cultivadas en cubreobjetos fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con 2 ml de metanol frío durante 5 min. Luego, las células fueron incubadas con DAPI a una concentración final de 1.5-3 µM durante 10 min. Una vez lavadas, las células fueron montadas utilizando Mowiol (Sigma #81381) y observadas al microscopio para evaluar contaminación por micoplasma.

2.3 SINCRONIZACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

Las células T98G cultivadas durante 24-48 h fueron sincronizadas mediante un *shock* de dexametasona (DEX) 100 nM durante 20 min a 37°C. Luego de la sincronización (tiempo 0), el medio fue reemplazado por DMEM libre de suero (condición **arresto parcial**) o DMEM+5% de SFB (condición **proliferación**) [20, 44]. En la Ilustración 10, se esquematiza la toma de muestras a distintos horarios post-sincronización de acuerdo a la condición de cultivo correspondiente. Posteriormente, las muestras fueron procesadas de acuerdo al experimento a realizar.

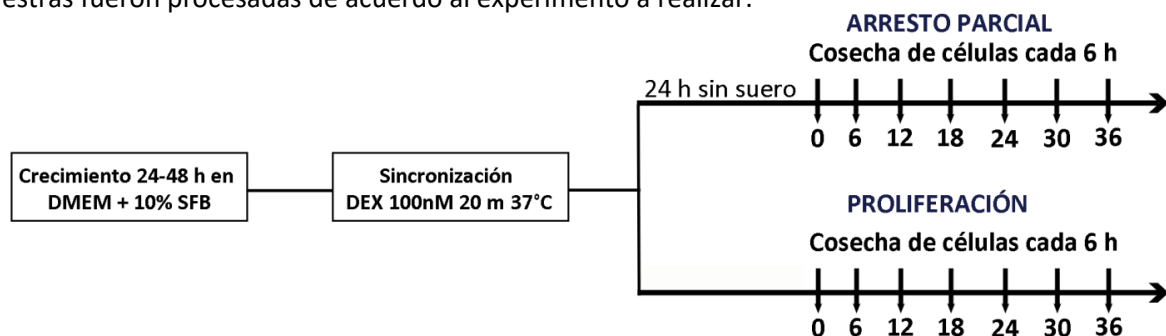


Ilustración 10: Protocolo de sincronización de las células T98G. Las células T98G fueron cultivadas en DMEM+10% SFB durante 24-48 h hasta alcanzar una confluencia entre 60-80%. Posteriormente, el medio de cultivo fue removido y las células T98G sincronizadas mediante un *shock* de DEX 100 nM durante 20 min a 37°C. Una vez sincronizadas, las células T98G se cultivaron en medio libre de SFB (condición **arresto parcial**) o en medio suplementado con 5% SFB (condición **proliferación**). Las muestras fueron tomadas a los distintos horarios post-sincronización, como se ejemplifica en la ilustración y procesadas según el experimento planeado. Dado que cada célula oscila con su propia fase, la sincronización permite ajustar las fases de las oscilaciones de todas las células, posibilitando la detección de la variable oscilatoria a nivel poblacional.

En el caso de las células A530, la sincronización se realizó mediante un cambio de medio de cultivo. Luego de la sincronización (tiempo 0), las células fueron recolectadas cada intervalo de 6 h durante 36 h para ensayos posteriores. En paralelo a la caracterización *in vitro* que se realizó de estas células, las mismas fueron utilizadas para realizar los experimentos *in vivo* propuestos en este proyecto.

2.4 MANEJO DE ANIMALES

Las células tumorales A530 o B16 fueron inyectadas en ratones C57BL/6 de 2-3 meses de edad mantenidos bajo ciclos regulares de 12h luz/12h oscuridad (LO). Las luces del bioterio se encienden a ZTO (7 am) y se apagan a ZT12 (7 pm); (ZT: *Zeitgeber time*). Para hacer referencia a los horarios de inyección de células tumorales, utilizaremos el término **ZT1-2** (1-2 h luego de prenderse la luz) y **ZT 12-13** (1 h luego de apagarse la luz).

En el caso de los experimentos en corrida libre (condiciones constantes de iluminación), los ratones previamente sincronizados a un ciclo regular de LO por varios días, se mantuvieron durante 72 h en oscuridad constante (OO) previo a la inyección de células tumorales y durante 15 días luego de la inyección. En estos experimentos, el horario de inyección se denominará como **CT** (*Circadian time*), ya que los animales no reciben ninguna señal externa o *Zeitgeber*. Por lo tanto, para hacer referencia a los horarios de inyección de células tumorales, utilizaremos los términos **CT1-2** (*día subjetivo*) y **CT12-13** (*noche subjetiva*).

En todos los casos, los animales se mantuvieron en condiciones de temperatura controlada y alimentación *ad-libitum*. El protocolo de inyección de células tumorales fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, Ordenanza 2139, Facultad de Ciencias Químicas, UNC).

2.5 TINCIÓN CON IODURO DE PROPIDIO Y CITOMETRÍA DE FLUJO.

Las células fueron cultivadas durante 24-48 h y posteriormente sincronizadas por un *shock* de DEX durante 20 min o cambio de medio de cultivo, según corresponda. Luego de la sincronización, las células mantenidas en proliferación (DMEM+ 5% SFB) o arresto parcial (DMEM libre de SFB) fueron recolectadas a diferentes tiempos, lavadas con PBS 1X frío y fijadas en etanol 70% frío gota a gota. Las células fijadas fueron mantenidas a -20°C al menos por 24 h.

Una vez fijadas, las células se centrifugaron a 1000-1500 rpm durante 20 min y se aspiró el etanol. El pellet obtenido fue resuspendido en 150 µl de solución de tinción (PBS conteniendo 50 µg/ml de yoduro de propidio y 10 µg de Ribonucleasa A) como fue reportado [44, 139]. El análisis del ciclo celular fue realizado con 50.000 células mediante un citómetro de flujo (Beckton Dickinson FACSCanto II). El programa usado para el análisis del ciclo celular fue el software *FlowJo*.

2.6 EXTRACCIÓN Y TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE ARN

A partir de cultivos celulares, el ARN total fue extraído mediante el reactivo Trizol (Invitrogen #15596-026) siguiendo las especificaciones del fabricante. El rendimiento y pureza del ARN fue estimado mediante el cociente de la densidad óptica a 260/280 nm. Posteriormente, 2 µg de ARN fueron utilizados como molde para la síntesis del ADN copia (ADNc) usando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega #1701), dNTPs (Promega #U1240), hexámeros al azar (Biodynamics #B070-40) y agua DEPC (libre de nucleasas de ADN y ARN) en un volumen final de 25 µl de acuerdo con indicaciones del fabricante. El ADNc obtenido fue utilizado posteriormente para evaluar la expresión de ARNm de distintos genes.

2.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) A TIEMPO FINAL

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue realizada utilizando 2 µl del ADNc previamente obtenido, 0.75 µl de *primers* específicos 10 µM (listados en la *Tabla 4*), 0.5 µl de dNTPs 10 mM (Promega #U1240) y 0.125 µl de la enzima GoTaq (Promega #M3001). El protocolo de ciclado se detalla a continuación (*Tabla 3*):

Tabla 3: Protocolo de ciclado de PCR

	Número de ciclos	Tiempo	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial	1	5 min	95
Amplificación:			
<i>Desnaturalización</i>	30-35	30 s	95
<i>Hibridación</i>		60 s	T _m
<i>Extensión</i>		30 s	72
Elongación	1	5 min	72

Los productos de amplificación fueron separados en un gel de agarosa mediante electroforesis utilizando SYBER safe (Invitrogen) para visualizar las bandas en el transiluminador. Las secuencias de *primers* específicos utilizados se enumeran en la siguiente tabla:

Tabla 4: Secuencias de *primers* y tamaño del producto amplificado por PCR

Transcripto	Primer <i>Forward</i> (5' → 3') Primer <i>Reverse</i> (5' → 3')	Tamaño amplicon (pares de bases)
<i>Tbp</i>	AGAACAATCCAGACTAGCGCA GGGAACCTTCACATCACAGCTC	100
<i>Bmal1</i>	GCAGTGCCACTGACTACCAAGA TCCTGGACATTGCATTGCAT	201

Transcripto	Primer Forward (5' → 3') Primer Reverse (5' → 3')	Tamaño amplicon (pares de bases)
<i>Per1</i>	CGGATTGTCTATATTTCCGGAGCA TGGGCAGTCGAGATGGTGT	142
<i>Bcl-2</i>	GAGTTCGGTGGGGTCATGTG CAACAAAGGCATCCCAGCCT	145

2.8 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

Las células T98G sincronizadas y mantenidas en proliferación o arresto parcial como se indicó anteriormente fueron cosechadas durante intervalos de 6 h durante 36 h en buffer RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay*: 150mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS y 50 mM Tris pH 8) conteniendo inhibidor de proteasas (Sigma). El contenido total de proteínas en los homogenatos fue determinado mediante el método Bradford (#500-0006 Bio-Rad) [259]. El lisado celular fue resuspendido en buffer de siembra (40% glicerol, 240mM Tris/HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.04% azul de bromofenol, 5% β -mercaptoetanol) e incubado a 90°C durante 5 min. Una cantidad total de 50 μ g de proteínas fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% durante 90 min a 120 voltios constantes como fue reportado previamente [44, 139]. Posteriormente, se realizó la transferencia a una membrana de PVDF (ThermoFisher Scientific), previamente sumergida por unos min en metanol, durante 1 h a 350 amperios constantes. El bloqueo se realizó en PBS suplementado con 5% de leche durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios (enumerados en la *Tabla 5*) fueron incubados *overnight* a 4°C, y posteriormente las membranas fueron lavadas 3 veces con buffer de lavado (PBS 1X suplementado con 0.1% Tween 20) durante 5 min.

Luego, se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios durante 1 h a temperatura ambiente. Para ello, se utilizaron anticuerpos secundarios (LI-COR) anti-IgG de conejo (verde) y anti-IgG de ratón (rojo) generados en cabra en una dilución 1:20000. Finalmente, las membranas fueron lavadas tres veces durante 5 min y escaneadas utilizando Odyssey IR Imager (LI-COR Biosciences). En todos los casos, se utilizó α -Tubulina como control de carga. La cuantificación de densitometría de las bandas específicas fue llevada a cabo mediante el software ImageJ.

Tabla 5: Anticuerpos utilizados en Western Blot

Anticuerpos	Huésped	Peso molecular (KDa)	Marca y catálogo	Dilución
PRX-SO _{2/3}	Conejo	22	Abcam (Cat# ab16830)	1:500
α -Tubulina	Raton	55	Sigma-Aldrich	1:1000

2.9 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE INMUNOCITOQUÍMICA

La expresión de las proteínas reloj también fue evaluada mediante inmunocitoquímica como fue descrito anteriormente [260]. Brevemente, los cultivos celulares fueron fijados durante 15 min en paraformaldehído al 4% en PBS y 10 min en metanol frío. Los cubreobjetos fueron lavados con PBS 1X, tratados con buffer bloqueante (*PBS suplementado con 0.1% BSA, 0.1% Tween 20 y 0.1% glicina*) e incubados *overnight* con el anticuerpo primario correspondiente (*Tabla 6*). Posteriormente, se realizaron dos lavados con buffer de lavado (*PBS 1X suplementado con 0.1% Tween 20*) y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, los cubreobjetos fueron lavados y visualizados mediante microscopia confocal (FV1200; Olympus). Los núcleos de las células fueron visualizados mediante tinción con DAPI. Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el software ImageJ.

Tabla 6: Anticuerpos utilizados en Inmunocitoquímica

Anticuerpo	Huésped	Marca y catálogo	Dilución
PER1	Ratón	Abcam (Cat# ab3443)	1:100
GLUTAMINA SINTASA	Ratón	Milipore (Cat# MAB302)	1:100
VIMENTINA	Ratón	Sigma (Cat# V5255)	1:750
GFAP	Conejo	Dako (Cat# V5255)	1:250
REV-ERB α	Ratón	Santa Cruz Biotechnology (Cat# sc-100910)	1:100

Los anticuerpos secundarios (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) anti-IgG de conejo (rojo) y anti-IgG de ratón (verde) utilizados en una dilución 1:1000 fueron generados en cabra.

2.10 DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células sincronizadas y mantenidas en su condición de cultivo correspondiente fueron cosechadas cada intervalo de 6 h durante 36 h. El estado redox de las células fue analizado mediante citometría de flujo como fue descrito [261]. Brevemente, el medio de cultivo fue removido y las células lavadas con PBS 1X frío fueron cosechadas mediante tripsinización. Un total de 4×10^5 células fueron resuspendidas en PBS 1X e incubadas con la sonda 2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína (Sigma #35845) en una concentración final de 2 μ M durante 40 min a 37°C. Las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X y la intensidad de fluorescencia fue analizada mediante citometría de flujo a 530nm cuando la muestra es excitada a 485nm. Se utilizó como control negativo una alícuota de células sin previa incubación con la sonda fluorescente. Además las células

fueron previamente incubadas con yoduro de propidio (50 µg/ml) a fin de discriminar la población de células vivas. El análisis de la intensidad de fluorescencia se realizó utilizando el software FlowJo.

2.11 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LÍPIDOS Y SEPARACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA

A partir de los homogenatos celulares cosechados a distintos horarios post-sincronización, se realizó la extracción de fosfolípidos de acuerdo al método de Bligh y Dyer [262]. Brevemente, los homogenatos fueron lavados dos veces con PBS 1X y resuspendidos en 800 µl de PBS 1X frío. El contenido total de fosfolípidos fue extraído con 3 ml de cloroformo: metanol (1:2 v/v) durante 20 min a temperatura ambiente. Una parte de cloroformo fue adicionado a la mezcla y homogenizado. Posteriormente, una parte de agua fue adicionada al homogenato dando una relación final de 2:2:1.8 cloroformo: metanol: agua (v/v/v), se vortexeó por algunos segundos y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a fin de obtener un sistema de dos fases (fase superior acuosa y fase inferior orgánica). Luego, se recuperó la fase orgánica inferior y fue lavada dos veces con lo que se denominó “fase superior teórica”. Brevemente, varios tubos fueron preparados con una relación final de 2:2:1.8 cloroformo: metanol: agua (v/v/v), se vortexeó y la fase superior fue adicionada a la fase inferior previamente recuperada. Finalmente, la fase orgánica fue secada con N₂, los lípidos resuspendidos en 800 µl de cloroformo:metanol (1:1) y conservados a -20°C.

Los lípidos individuales fueron separados en sílica gel (Macherey-Nagel) previamente sumergidos en 1.2% H₃BO₃ (en etanol:agua 1:1) mediante un sistema de solventes compuesto por acetato de metilo: isopropanol: cloroformo: metanol: 0.025% KCl (25:25:25:10:9, v/v/v/v/v) como fue descrito [263]. Los estándares y lípidos individuales fueron visualizados utilizando acetato cúprico 3% en ácido fosfórico 8% y posteriormente incubados a 170°C durante 10 min en estufa [264]. Las bandas obtenidas para cada fosfolípido fueron cuantificadas mediante el programa ImageJ.

2.12 DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA FOSFOHIDROLASA DE ÁCIDO FOSFÁTICO

Las células T98G fueron sincronizadas y mantenidas en arresto parcial o proliferación cosechándose muestras cada 6 h durante 36 h. Las muestras fueron resuspendidas en PBS 1X conteniendo inhibidor de proteasas (Sigma), y posteriormente se cuantificó la cantidad de proteínas mediante Bradford [259]. La cuantificación de la actividad de la enzima fosfohidrolasa de ácido fosfatídico (PAP) fue medida en el laboratorio de la Dra. Susana Pasquaré (Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca, INIBIBB-CONICET) con quienes mantenemos colaboración. La cuantificación fue determinada por el monitoreo de la liberación de 1,2 diacil-[2-³H]-glicerol (DAG) desde [2-³H]-ácido fosfatídico (PA) como fue descrito previamente [265, 266]. La mezcla de reacción se conformaba de 50 mM Tris-maleato pH 6.5, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM

EGTA, 0.2 mM Mg²⁺ y 100 µg de proteínas provenientes del homogenato celular en un volumen final de 0.2 ml. La reacción se inició al adicionar 0.6 mM de [2-³H]-fosfatidato más 0.4 mM de PC y se detuvo a los 20 min por adiciones de cloroformo: metanol (2:1, v/v). El DAG fue separado por TLC en silica gel 60 [267] utilizando el siguiente sistema de corrida: hexano: dietil éter: ácido acético (35:65:1, v/v/v). En este sistema, el DAG migra ¾ de la placa y tanto el PA como MAG quedan retenidos en el punto de siembra. Para separar el MAG del PA, las placas fueron corridas nuevamente utilizando hexano:dietil éter: ácido acético (20:80:2.3, v/v/v) como solvente. La actividad de la enzima PAP fue expresada como la suma de DAG marcado más MAG por min y µg de proteína.

2.13 TRATAMIENTO CON BORTEZOMIB Y DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Las células sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 1 x 10⁴ fueron cultivadas *overnight* a 37 °C para permitir su adhesión a la placa. Las células T98G y A530 fueron sincronizadas y tratadas con Bortezomib (BOR, 500nM) a los diferentes tiempos post-sincronización durante 36 y 24 h, respectivamente. Como control positivo de viabilidad se utilizaron células sin el tratamiento con la droga. Posteriormente, 10 µl del reactivo MTT (5 mg/ml; Sigma #M2128) fueron adicionados a cada pocillo e incubados durante 2 h a 37°C como fue descrito [268]. Luego, 100 µl de DMSO: isopropanol (1:1, v/v) fueron adicionados a cada pocillo seguido de la incubación por algunos min a temperatura ambiente protegidos de la luz. Las muestras fueron analizadas a una longitud de onda de 570 nm en el espectrofotómetro *Epoch*.

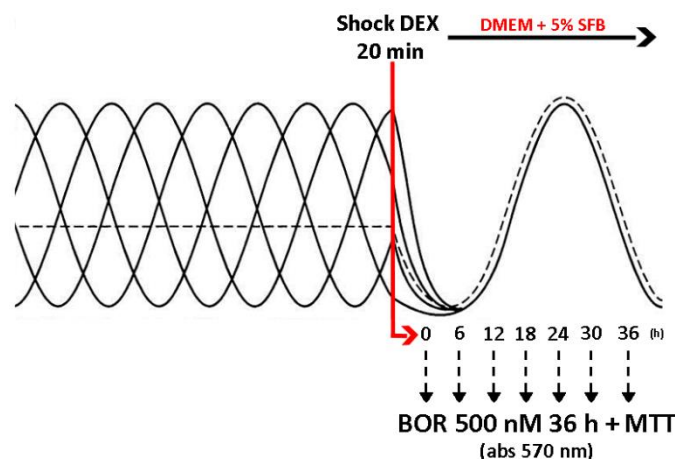


Ilustración 11: Esquema representativo del protocolo de sincronización y tratamiento de células T98G con el quimioterapéutico BOR. Las células T98G cultivadas en placas de 96 pocillos fueron sincronizadas mediante una *shock* de DEX (100 nM, 20 min) y mantenidas en DMEM+5% SFB. A cada uno de los tiempos post-sincronización, se adicionó el BOR (500 nM) durante 36 h. Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT considerando el 100% de viabilidad aquellas células incubadas con el vehículo de la droga (DMSO).

2.14 DISRUPCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BMAL1 MEDIANTE LA TECNOLOGÍA CRISPR/CAS9

Con el objetivo de disminuir la expresión de *Bmal1* en las células en estudio, se implementó la tecnología de edición de genes CRISPR/Cas9 como fue reportado anteriormente [269]. Brevemente, se diseñaron RNA guías (sgRNA) específicos utilizando el sitio web <https://zlab.bio/guide-design-resources> a partir de la secuencia genómica de *Bmal1* de humano o ratón para las células T98G y A530, respectivamente (Tabla 7). Tales secuencias fueron subclonadas en el vector PX459 (Addgene #48139) previamente digerido con la enzima de restricción *BbsI* (NEB #R0539S) para obtener el plásmido *PX459-Bmal1*. Las células fueron transfectadas con Lipofectamine 2000 (Invitrogen #11668-030) y seleccionadas con puromicina (2 µg/ml). El pool de células transfectadas fue denominado **T98G E1** o **A530 A5**. La disminución de la expresión de *Bmal1* fue chequeada mediante RT-PCR y efectos adicionales fueron encontrados en las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo y en la expresión del gen *target* aguas abajo *Per1* mediante RT-PCR e inmunocitoquímica.

Tabla 7: Secuencias de sgRNA clonadas en el plásmido PX459

Células	Secuencia sgRNA (5' → 3') Secuencia sgRNA complementaria (5' → 3')	Dirigido a
T98G	CTGGCTAGAGTGTATACGTT GACCGATCTCACATATGCAA	Exón 2 secuencia genómica <i>Bmal1</i> de <i>homo sapiens</i> .
A530	AGGTGCCTGTTTACCCGCGC GCGCGGGTAAACAGGCACCT	Exón 1 secuencia genómica <i>Bmal1</i> de <i>mus musculus</i> .

2.15 TRATAMIENTO CON SR9009 EN CÉLULAS T98G Y DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Los efectos del compuesto SR9009 (Milipore #554726), el cual actúa como agonista específico de los genes reloj REV-ERBs, fueron evaluados sobre la viabilidad de células T98G. Para ello, las mismas fueron sembradas a una densidad de 1×10^4 por pocillo y mantenidas *overnight* a 37°C en estufa para permitir su adhesión a la placa. Posteriormente, las células mantenidas en proliferación fueron tratadas con 10, 20 y 40 µM del compuesto SR9009 durante 24, 48 y 72 h, y finalmente se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT como fue descrito anteriormente.

Luego de definir la concentración del compuesto SR9009 (20 µM) que permite matar al menos el 50% de la población de células T98G, se analizó si existía una respuesta diferencial en el tiempo de la susceptibilidad a dicho tratamiento. Nuevamente, se sembraron células T98G a una densidad de 1×10^4 en una placa de 96 pocillos y fueron mantenidas *overnight* a 37°C. Luego, las células T98G sincronizadas mediante un *shock* de DEX (100 nM, 20 min), fueron tratadas con el compuesto SR9009 a cada uno de los tiempos post-sincronización durante 48 h (Ilustración 12). La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT descrito anteriormente.

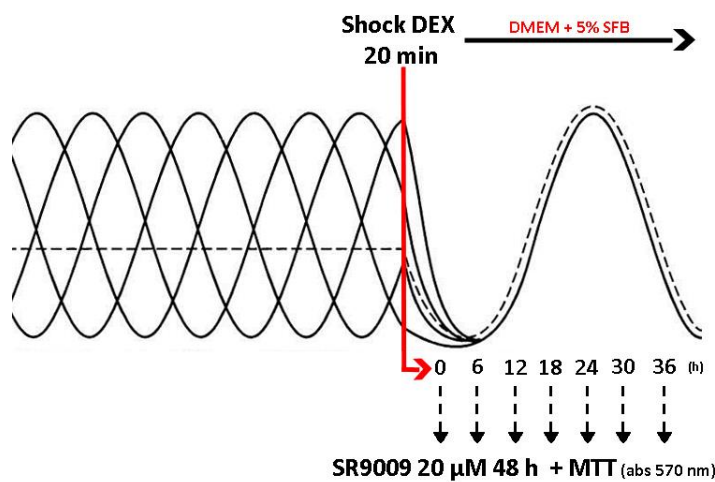


Ilustración 12: Esquema representativo del protocolo de sincronización y tratamiento de células T98G con el compuesto SR9009. Las células T98G fueron sincronizadas mediante un *shock* de DEX (100 nM, 20 min) y mantenidas en DMEM+5%SFB. A cada uno de los tiempos post-sincronización, se adicionó el compuesto SR9009 (20 µM) durante 48 h. Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular mediante MTT considerando el 100% de viabilidad aquellas células incubadas con el vehículo de la droga (DMSO).

2.16 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS T98G TRATADAS CON SR9009

Para evaluar si el compuesto SR9009 afecta la progresión del ciclo celular realizamos el siguiente protocolo de trabajo (*Ilustración 13*). Las células T98G fueron arrestadas durante 36 h en DMEM libre de SFB conteniendo DMSO (vehículo) o SR9009 (20 µM). Luego de 36 h, se realizó un cambio de medio de cultivo y las células fueron estimuladas con 20% SFB durante 16 h en presencia de DMSO o SR9009, según corresponda. Por último, las células fueron cosechadas mediante tripsinización y se analizó el ciclo celular por citometría de flujo como fue descrito anteriormente. El objetivo de este experimento es evaluar si las células una vez arrestadas son capaces de reingresar al ciclo celular luego del estímulo.

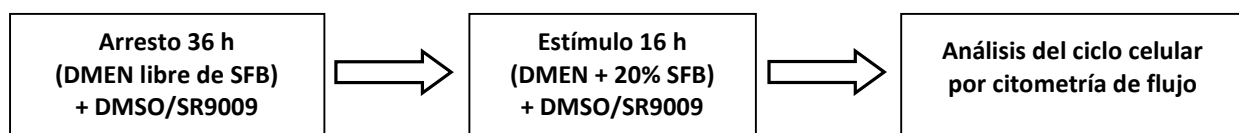


Ilustración 13: Esquema representativo del protocolo para evaluar la progresión del ciclo celular en células T98G tratadas con SR9009. Las células T98G fueron arrestadas durante 36 h en medio libre de SFB conteniendo DMSO o SR9009 (20 µM). Posteriormente, las células son estimuladas con 20% SFB durante 16 h en presencia de DMSO o SR9009. Por último, se evalúa el ciclo celular por citometría de flujo en ambas poblaciones de células previamente fijadas con etanol 70% y marcadas con yoduro de propidio.

2.17 DETERMINACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS MEDIANTE TINCIÓN Y MICROSCOPIA CONFOCAL

A los efectos de evaluar que implicancias tiene el agonista SR9009 sobre distintas vías metabólicas en las células T98G, nos planteamos investigar la acumulación de lípidos en las denominadas gotas lipídicas (GLs) o LDs (*Lipid Droplets*, por sus siglas en inglés). Para ello, las células T98G control (DMSO) y tratadas (SR9009, 20µM 48 h) fueron fijadas con paraformaldehído 4% durante 15 min a temperatura ambiente seguido de dos lavados con PBS 1X. Para la determinación de GLs, se

utilizó el compuesto Nile red (Sigma #N3013) el cual es un colorante utilizado para detectar GLs intracelulares [270]. De esta manera, las células de ambas condiciones fueron incubadas con Nile red en una concentración final de 1 µg/ml en PBS 1X durante 15 min protegidas de la luz. Luego, se realizaron tres lavados de 5 min con PBS 1X y un lavado final con agua miliQ. Los núcleos de las células fueron teñidos con DAPI. Por último, los cubreobjetos fueron montados con Mowiol (Sigma #81381) en los portaobjetos y visualizados mediante microscopia confocal (FV1200; Olympus) en el Centro de Microscopia y Nanoscopia de Córdoba (CEMINCO, UNC-CONICET). Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el software *ImageJ* determinando el tamaño promedio de las GLs en las muestras en estudio.

2.18 DETERMINACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Otra forma de determinar los niveles de GLs en cultivos celulares es mediante citometría de flujo. Para ello, las células T98G control (DMSO) y tratadas (SR9009, 20 µM 48 h) fueron cosechadas mediante tripsinización y lavadas dos veces con PBS 1X. Luego, las células resuspendidas en PBS 1X fueron incubadas con Nile Red (1 µg/ml) durante 15 min a temperatura ambiente protegidas de la luz. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X, resuspendidas en 150 µl de PBS y analizadas mediante citometría de flujo (BD LSRFortessa™ cell analyzer) utilizando el filtro 575/26. Los resultados obtenidos del citómetro fueron analizados mediante el software *FlowJo* para determinar la intensidad de fluorescencia de las muestras en estudio.

2.19 GENOTIPIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS A530

A fin de evaluar la pérdida de las copias WT de los genes *Nf1* y *Trp53* en las células A530, se extrajo ADN genómico de las células en cultivo. Para ello, las células fueron incubadas a 56°C en buffer TNES (*Tris 10mM pH 7.5, NaCl 400mM, EDTA 100mM, 0.6% SDS*) con la adición de Proteinasa K (Promega). Posteriormente, se adicionó NaCl 6M y se centrifugó a 13200 rpm a 4°C durante 5 min. El sobrenadante obtenido fue precipitado con etanol 95% frío (v/v) y posteriormente, el pellet obtenido fue lavado con etanol 70% (v/v). Por último, el ADN recuperado fue resuspendido en agua libre de nucleasas y conservado a -20°C para ensayos posteriores. Mediante la reacción de la polimerasa en cadena, se amplificaron secuencias específicas correspondientes a las copias WT o mutante de los genes *Nf1* y *Trp53* (Tabla 9). Los reactivos utilizados se enumeran en la Tabla 8:

Tabla 8: Reactivos utilizados para la amplificación de ADN genómico

Buffer (Promega #M791A)	
dNTPs (Promega #U1240)	
<i>Primers para el gen Nf1</i>	Nf1 com
	Nf1 wt
	Nf1 mut
<i>Primers para el gen Trp53</i>	X7
	X6.5
	XNeo 18
ADN	
Polimerasa (Promega #M3001)	
Agua libre de nucleasas	

Tabla 9: Secuencia de primers de los genes *Nf1* y *Trp53* y patrón de bandas

Gen	Nombre del primer	Secuencia (5' → 3')	Patrón de bandas
<i>Nf1</i>	Nf1 WT	TTCTGGCCTTATTGGACACC	WT (Nf1 COM- Nf1 WT): 374 pb MUT (Nf1 COM- Nf1 MUT) 274 y una banda menor
	Nf1 COM	GCACAAAAGAGGCACTGGAT	
	Nf1 MUT	GGAGAGGTTTTTGCTTCCT	
Gen	Nombre del primer	Secuencia (5' → 3')	Patrón de bandas
<i>Trp53</i>	X7	TATACTCAGAGCCGGCCT	WT (X7-X6.5): 450 pb MUT (X7- NEO18) 550 pb
	X6.5	ACAGCGTGGTGGTACCTTAT	
	NEO18	CTATCAGGACATAGCGTTGG	

Los productos de amplificación fueron separados en un gel de agarosa mediante electroforesis utilizando SYBER safe (Invitrogen) para visualizar las bandas en el transiluminador.

2.20 GENERACIÓN DE TUMORES A PARTIR DE LA INYECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES

Los estudios *in vivo* descritos en la presente tesis se realizaron a partir de la generación de tumores provenientes de la inyección de células A530 o B16. En primer lugar, las células tumorales A530 provenientes del sistema nervioso periférico fueron sincronizadas mediante un cambio de medio de cultivo y lavadas en PBS 1X. Posteriormente, una cantidad de 1×10^5 células en 10 μ l de PBS fueron inyectadas en la zona del nervio ciático de ratones C57BL/6. A los 15-17 días post-inyección, los tumores comenzaron a ser palpables y se realizó el monitoreo del crecimiento tumoral. En paralelo, se realizó el seguimiento del peso de los animales los cuales fueron sacrificados alrededor del día 30 post-inyección.

En el caso de la inyección de las células B16 de melanoma murino, las mismas fueron sincronizadas mediante un cambio de medio de cultivo y lavadas con PBS 1X. Posteriormente, una cantidad de 5×10^5 células en 50 μL de PBS fueron inyectadas de manera subcutánea en uno de los flancos del ratón. Los tumores comenzaron a ser palpables alrededor del día 7-10 luego de la inyección. El crecimiento del tumor fue monitoreado periódicamente al igual que el peso corporal de los animales. Los mismos fueron sacrificados alrededor del día 15 post-inyección.

Cabe destacar que la inyección de células de ambos modelos tumorales se realizó bajo distintas condiciones experimentales como es detallado en el Capítulo IV.

2.21 DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO TUMORAL

El crecimiento de los tumores generados a partir de células A530 o B16 fue monitoreado mediante mediciones periódicas utilizando un calibre. Posteriormente, el volumen de los tumores provenientes de la inyección de células A530, fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula: ancho x largo x alto. En el caso de los tumores generados a partir de la inyección de células B16, se utilizó la fórmula: $(\text{ancho}^2 \times \text{largo})/2$ para calcular el volumen tumoral.

Posteriormente, la velocidad de crecimiento tumoral se calculó como la pendiente de la regresión lineal de la transformada logarítmica del volumen tumoral de cada animal, según fue reportado previamente [271] (Ilustración 14).

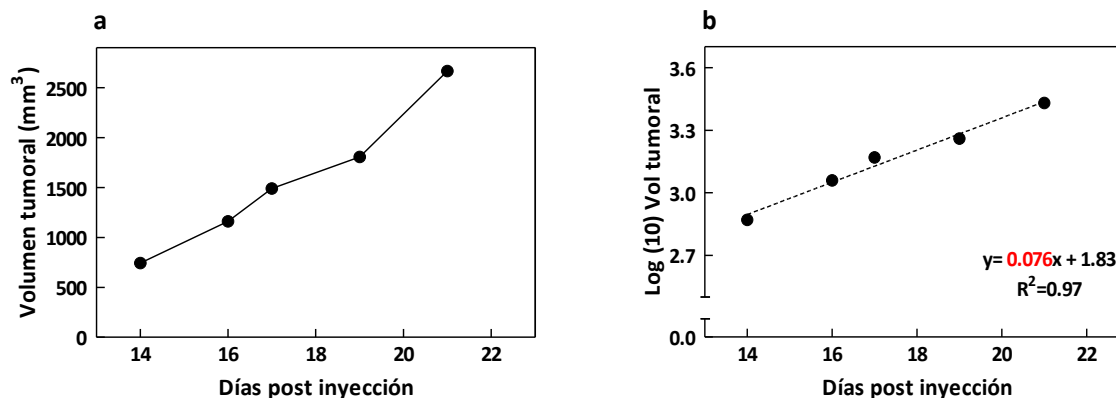


Ilustración 14: Determinación de la velocidad de crecimiento tumoral. a) Seguimiento del volumen tumoral (mm^3) en función de los días post-inyección; b) Regresión lineal de la logarítmica del volumen tumoral en la cual la pendiente en rojo indica la velocidad de crecimiento.

2.22 TRATAMIENTO QUIMIOTERAPEUTICO DE TUMORES PROVENIENTES DE CÉLULAS A530

A fin de evaluar la implementación de un tratamiento quimioterapéutico desde el punto de vista cronobiológico, los tumores provenientes de las células A530 fueron tratados con el quimioterapéutico BOR a distintos horarios. Una vez que los tumores fueron palpables, alrededor del día 15 post-inyección, los ratones fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos experimentales. La administración del BOR se realizó por vía intraperitoneal al comienzo de la fase de descanso (ZT 1-

2) o al comienzo de la fase activa (ZT12-13), cada grupo con sus respectivos animales controles a los cuales se les inyectó el mismo volumen de DMSO (vehículo de la droga). El protocolo consistió en 4 dosis de BOR (1.5 mg/kg en 30 µL de DMSO) [272] durante una semana en combinación con mediciones periódicas del volumen tumoral y registro del peso de los animales. Una vez finalizado el tratamiento, se calculó la velocidad de crecimiento tumoral de los grupos experimentales, como fue descrito en los párrafos anteriores (*Ilustración 14*). Posteriormente, con el objetivo de evaluar la eficiencia del tratamiento quimioterapéutico a los distintos horarios de administración, se calculó el índice TGI (*tumor growth inhibition*, por sus siglas en inglés), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{TGI (\%)} = \frac{1 - [(Tf/Ti)/(Cf/Ci)]}{1 - (Ci/Cf)} \times 100$$

donde:

Tf: volumen final promedio de cada grupo tratado con BOR
Ti: volumen inicial promedio de cada grupo tratado con BOR
Cf: volumen final promedio de cada grupo control
Ci: volumen inicial promedio de cada grupo control

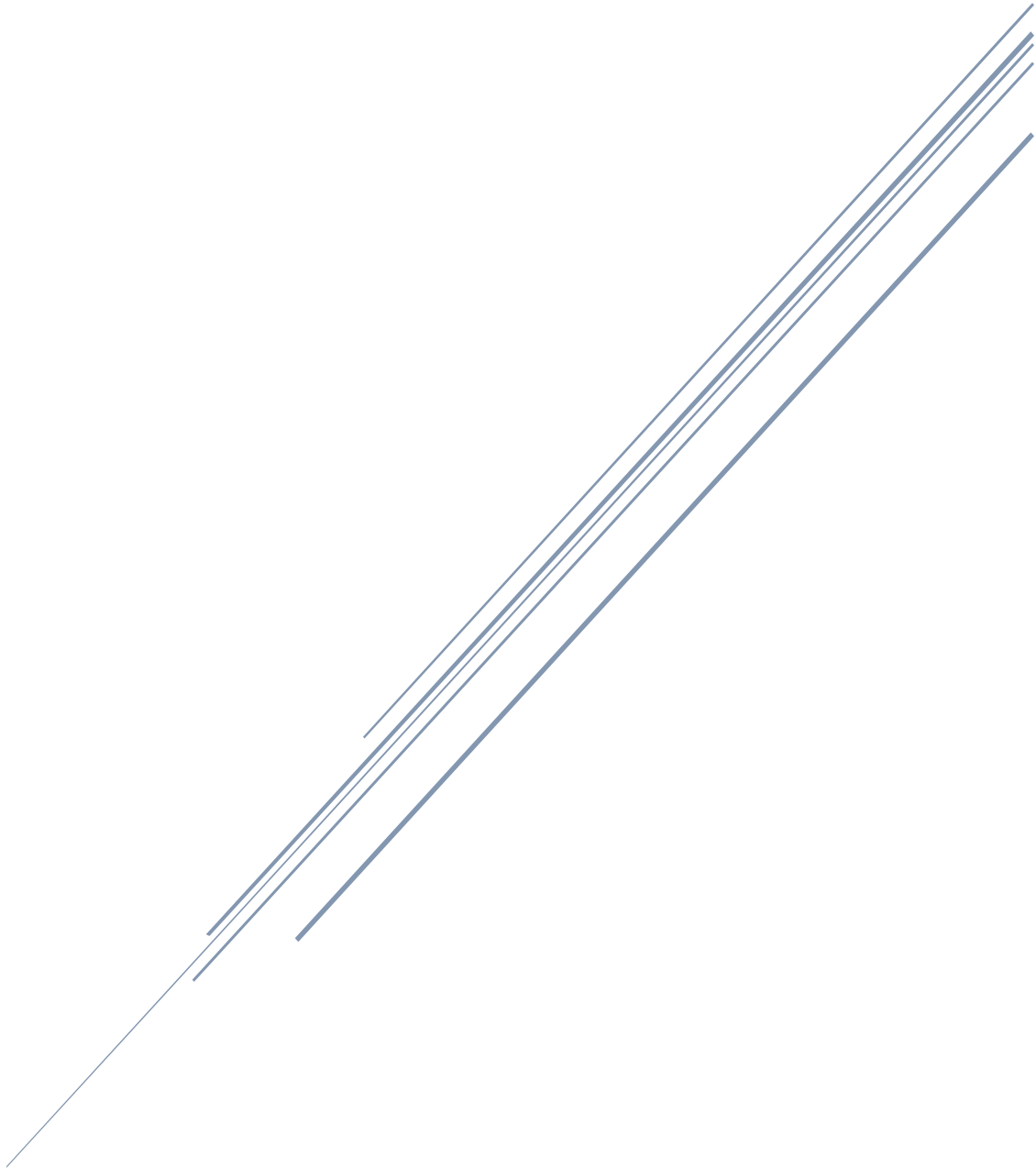
2.23 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Infostat (Versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) o GraphPad Prism. Las pruebas de normalidad y homogeneidad de la varianza se realizaron mediante los test de Shapiro–Wilks modificado y Levene, respectivamente. Cuando los supuestos de distribución normal se cumplían, las comparaciones entre medias se realizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) a una o dos vías para testear los efectos del tiempo o tratamiento de las drogas, seguida de un test a posteriori cuando presentaban diferencias entre medias. Cuando se infringía la normalidad de los residuos se utilizó estadística no paramétrica mediante el test de Kruskal-Wallis (K-W), empleando una comparación de a pares. En el caso de los experimentos que presentan dos grupos experimentales, se realizó la comparación entre pares mediante un t-test o test no paramétrico Mann Whitney (M-W) cuando se infringía la normalidad de los residuos. Los datos se presentan como media ± EE, el tamaño muestral (n) se indica para cada experimento, y se consideró un valor significativo $p < 0.05$.

Por otro lado, se realizó un análisis periódico a fin de corroborar si los perfiles obtenidos en cada parámetro evaluado se correlacionan con una curva periódica. Para tal fin, se aplicó el análisis COSINOR [273] o RAIN cuando se infringía los supuestos del modelo [274]. El análisis consideró periodos de 8 a 32 h y un valor significativo $p < 0.05$. Los análisis periódicos fueron realizados con la asistencia del Dr. Lucas Gorné (IMBIV, CONICET-UNC).

CAPITULO III

Oscilaciones metabólicas y susceptibilidad a drogas
antitumorales en células T98G



CAPITULO III: OSCILACIONES METABÓLICAS Y SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUMORALES EN CÉLULAS T98G

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar el metabolismo de células T98G sincronizadas y el estado redox en células silenciadas para el activador molecular *Bmal1*.
- Evaluar la susceptibilidad a drogas antitumorales (Bortezomib y SR9009) en función del estado metabólico y del reloj molecular.

3.2 RESULTADOS

3.2.1 Caracterización de las células T98G en cultivo

Las células T98G provenientes de glioblastoma multiforme de un hombre de 61 años exhiben características típicas de células cancerosas con una ronda de división del ciclo celular cercana a las 24-28 h y presentan recuento de cromosomas hiperpentaploides. Las mismas crecen adheridas a la placa de cultivo y su crecimiento no se inhibe por contacto entre ellas. Como puede observarse en la Figura 1, estas células expresan marcadores gliales como glutamina sintasa (GS), vimentina y proteína fibrilar acídica glial (GFAP).

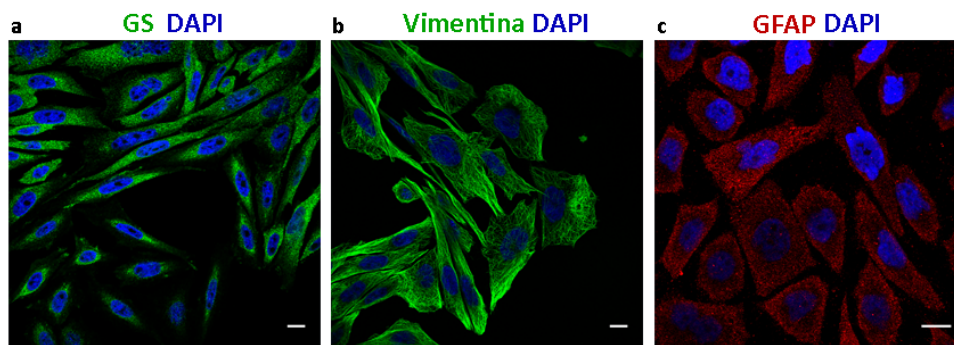


Figura 1: Marcadores gliales en células T98G en cultivo. Imágenes representativas de microscopia confocal evidenciando que las células T98G presentan marcadores típicos de origen glial como la glutamina sintasa (a), vimentina (b) y proteína fibrilar acídica glial (c). Los núcleos fueron visualizados mediante tinción con DAPI. Barra=10 μ m.

3.2.1.1 Distribución de las fases del ciclo celular

Para llevar a cabo los objetivos planteados en esta tesis, en primer lugar, caracterizamos las condiciones experimentales en cultivo en relación a la tasa de proliferación. Para ello, las células crecidas a un 50% de confluencia en DMEM suplementado con 10% SFB fueron sincronizadas con un *shock* de DEX 100 nM durante 20 min a 37°C (t_0). Luego de la sincronización, las células fueron mantenidas en medio libre de suero (**Arresto Parcial**) para lograr la quiescencia durante 24 h o

suplementado con 5% de SFB (**Proliferación**). Independientemente del ciclo celular, un protocolo de sincronización es esencial para ajustar las células individuales dentro del cultivo a una misma fase. Se observó por citometría de flujo que la mayoría de las células cultivadas en medio libre de suero se encontraban arrestadas en la fase G_0/G_1 (aproximadamente 60-80%). Tal distribución de la población celular se mantuvo aproximadamente constante en los tiempos examinados (Fig. 2a-b). En cambio, las células mantenidas en medio de cultivo suplementado con 5% SFB luego de la sincronización se mantuvieron constantes en los tiempos examinados hasta las 30 h, con un promedio mayor al 50% de células en las fases S y G_2/M (Fig. 2c-d).

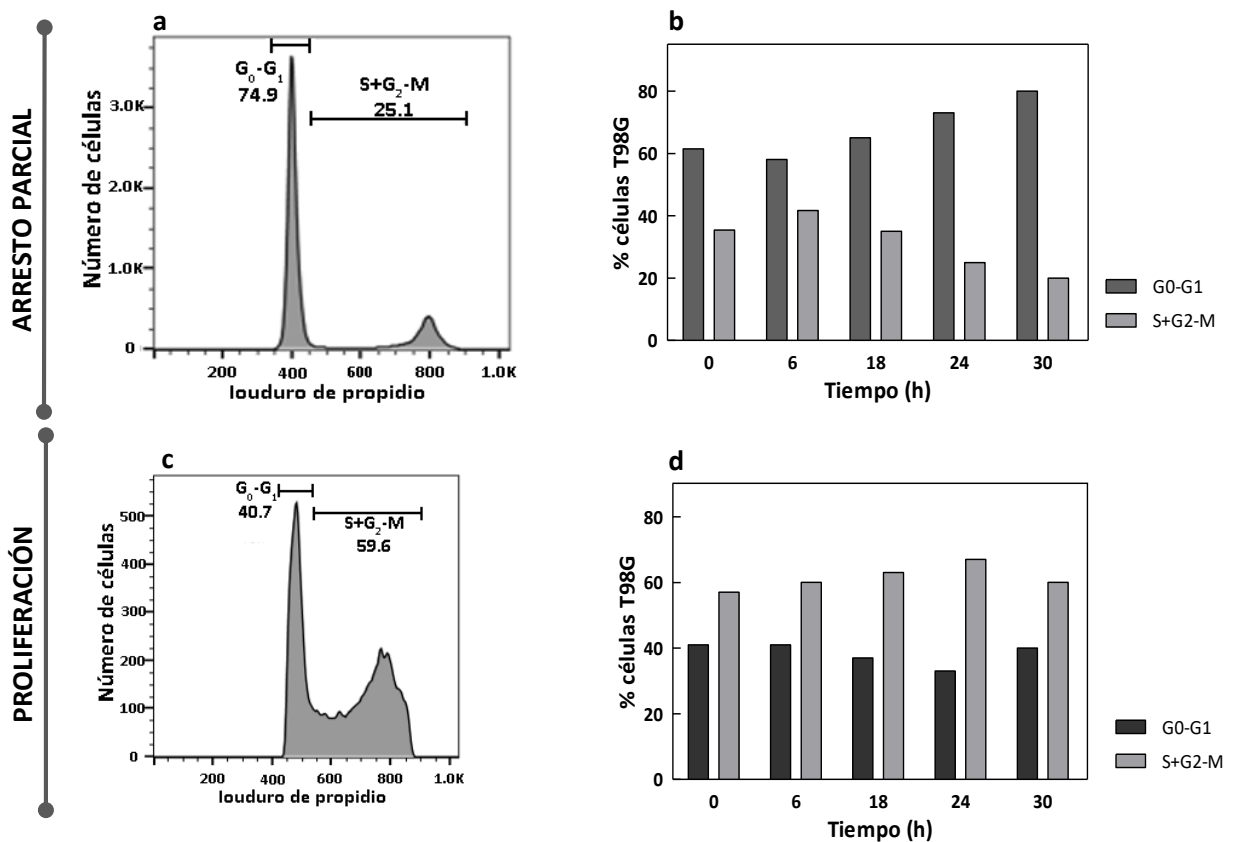


Figura 2: Distribución del ciclo celular dependiendo de la condición de cultivo. Las células T98G sincronizadas y mantenidas en ausencia de suero (**Arresto Parcial**) o suplementado con 5% SFB (**Proliferación**) fueron recolectadas a distintos tiempos, marcadas con ioduro de propidio y analizadas por citometría de flujo. Histograma representativo de la distribución del ciclo celular en células en arresto parcial (a) o proliferación (c). Cuantificación del porcentaje de células T98G en cada fase del ciclo celular, mostrando que células arrestadas presentan aproximadamente 60-80% en fase G_0/G_1 (b), mientras que las células en proliferación presentan un porcentaje mayor al 50% en fase S+ G_2/M (d).

3.2.1.2 Caracterización de las células T98G E1

Con el objetivo de evaluar si existe relación entre el reloj molecular y el oscilador metabólico/redox, se planteó alterar la expresión del gen reloj *Bmal1* en células T98G. Para ello, se utilizó la tecnología de edición CRISPR/Cas9 y posterior selección de las células transfectadas con

antibiótico. Mediante RT-PCR, se evidenció la disminución del ARNm de *Bmal1* y de su gen target *Per1* en el pool de células transfectadas denominado **T98G E1** (Fig. 3).

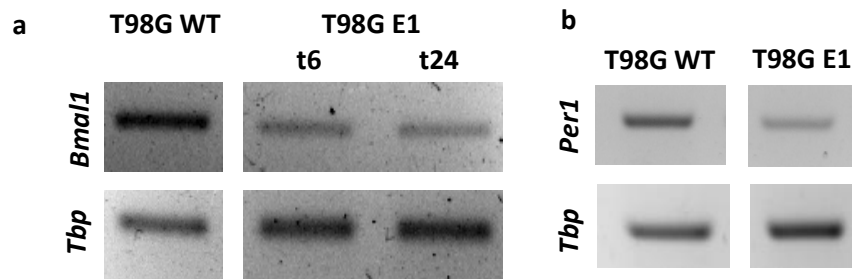
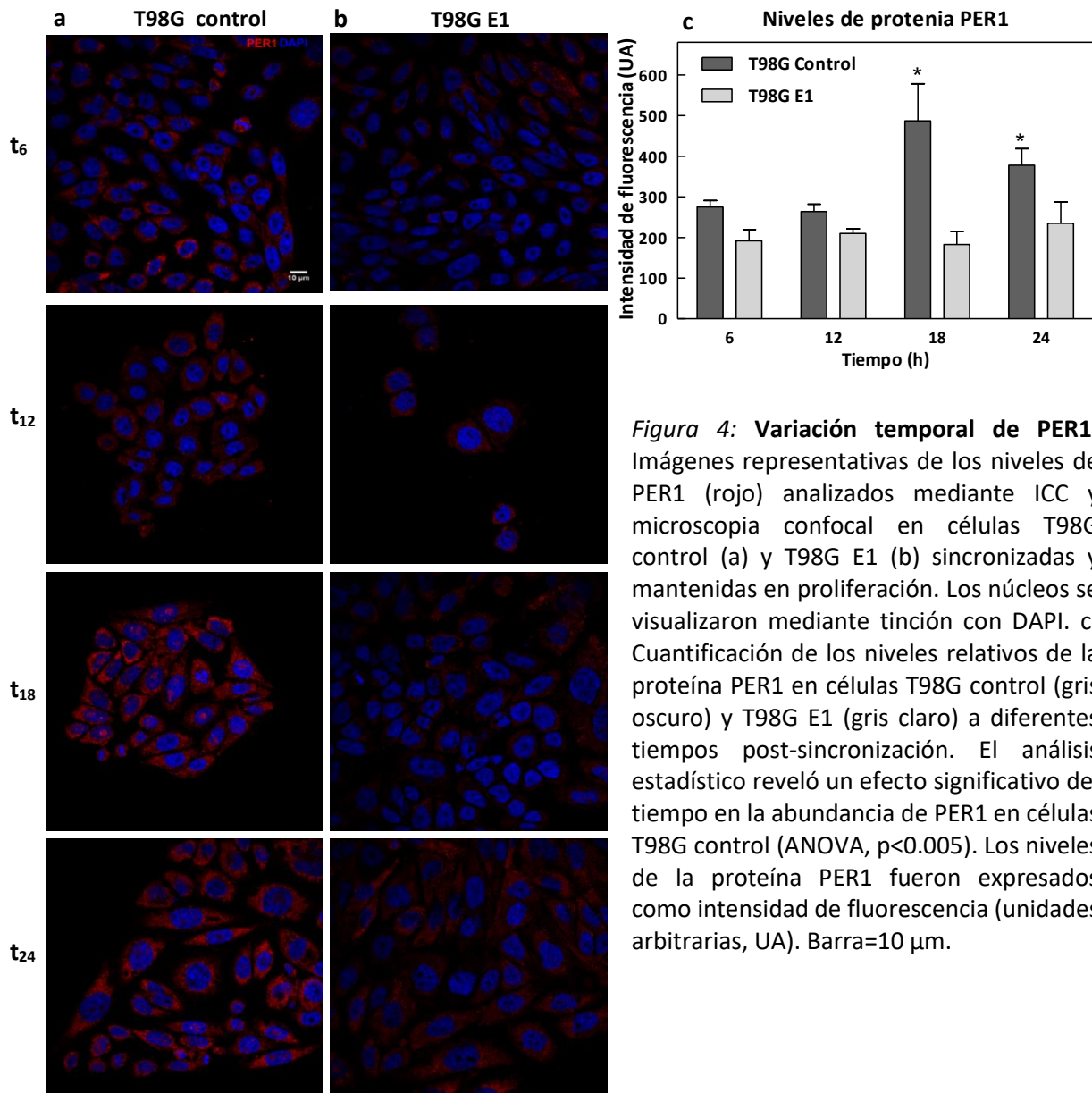


Figura 3: Expresión de los genes *Bmal1* y *Per1* en células T98G y T98G E1. En el pool de células T98G E1, se evaluó la expresión del ARNm de *Bmal1* (a) y de su gen target *Per1* (b) mediante RT-PCR evidenciando una disminución en la expresión de ambos ARNm en relación a las células T98G. Los niveles de ARNm fueron normalizados por la expresión del gen *Tbp* (*TATA-binding protein*, por sus siglas en inglés).

Cabe destacar que los experimentos se realizaron con una población de clones de células seleccionadas con antibiótico, lo cual podría explicar la disminución parcial del gen *Bmal1*. Además, las células T98G presentan un recuento de cromosomas hiperpentaploides, lo cual podría dificultar el silenciamiento total del gen.

En segundo lugar, se evaluaron los niveles de la proteína PER1 mediante inmunocitoquímica en muestras recolectadas de células T98G control y T98G E1 post-sincronización. Los resultados evidenciaron una oscilación significativa en los niveles de proteína PER1 en células T98G control (ANOVA, $p < 0.005$) con mayores niveles a las 18 y 24 h post-sincronización (Fig. 4a, 4c). Por el contrario, las células T98G transfectadas con el plásmido PX459-*Bmal1* mostraron niveles reducidos de la proteína PER1 y no se evidenciaron diferencias temporales en la abundancia de la misma a lo largo de las 24 h examinadas (Fig. 4b, 4c).



En conjunto, estos resultados demuestran que el pool de células T98G E1 presenta menores niveles de ARNm tanto de *Bmal1* como de su gen target *Per1*. A su vez, la población de células T98G E1 presenta alteraciones en la función del activador molecular BMAL1 lo cual fue corroborado por la ausencia de una variación temporal significativa de la proteína PER1 en esta población respecto a las células T98G control.

3.2.2 Oscilaciones metabólicas en células T98G

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, evidenciaron variaciones temporales significativas en la expresión del ARNm de genes reloj (*Per1*, *Rev-erb*) y genes controlados por el reloj (*Pcyt-2*, *ChoKa*) en células T98G en arresto parcial, mientras que en la condición de proliferación tales oscilaciones se perdían. Por el contrario, la marcación metabólica de ^{32}P -GFLs evidenció oscilaciones

circadianas en ambas condiciones de cultivo [275]. Es por ello que nos planteamos estudiar si podría existir un reloj metabólico que ayude a controlar los ritmos en células T98G en proliferación aun cuando el reloj molecular se encuentre alterado. A continuación, se presentan los resultados obtenidos para verificar la hipótesis planteada.

3.2.2.1 Variaciones temporales en el contenido de lípidos

Como se nombró anteriormente, la marcación metabólica de fosfolípidos totales con ^{32}P -ortofosfato en células T98G exhibió oscilaciones temporales tanto en arresto parcial como en proliferación [275]. Tales resultados sugieren un control temporal principalmente a nivel de síntesis de glicerofosfolípidos (GFLs). Por tal motivo nos preguntamos si estos cambios temporales también ocurren en los niveles de GFLs individuales endógenos. Para ello, se extrajeron GFLs endógenos a partir del cultivo de células T98G mantenidas en proliferación a distintos horarios post-sincronización. Los GFLs extraídos fueron separados mediante TLC, identificados por comparación de la corrida con estándares específicos y cuantificados individualmente por densitometría utilizando el software *ImageJ*. A continuación, se presenta una placa ilustrativa de los experimentos realizados.

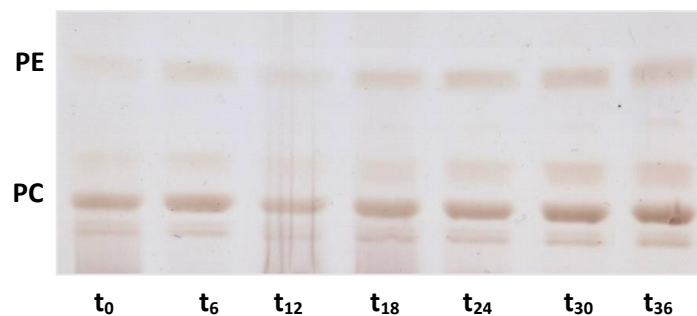


Figura 5: Composición temporal del contenido lipídico en células T98G sincronizadas. Los fosfolípidos extraídos a distintos tiempos a partir de las células sincronizadas fueron separados mediante TLC y cuantificados individualmente de acuerdo a su migración en la placa (PE, fosfatidiletanolamina; PC, fosfatidilcolina). La cuantificación y el análisis estadístico se muestran en la Figura 6.

A fin de establecer si existen cambios temporales en la abundancia de los fosfolípidos individuales, las bandas correspondientes a cada uno de ellos fueron cuantificadas mediante densitometría y relativizada a la cantidad de proteína total correspondiente a la muestra sembrada para la corrida. Si bien los niveles de PC no varían significativamente en el tiempo, el contenido de PE y la relación PC/PE muestra una marcada oscilación con un periodo de 24 h (COSINOR, $p < 0.03$) (Fig. 6).

Las comparaciones por pares mediante el test de Duncan revelan que los niveles de PE a tiempo 0 y 12 h post-sincronización difieren del pico observado al tiempo 30, mientras que los niveles de PC al tiempo 12 fueron significativamente menores que el pico evidenciado al tiempo 6.

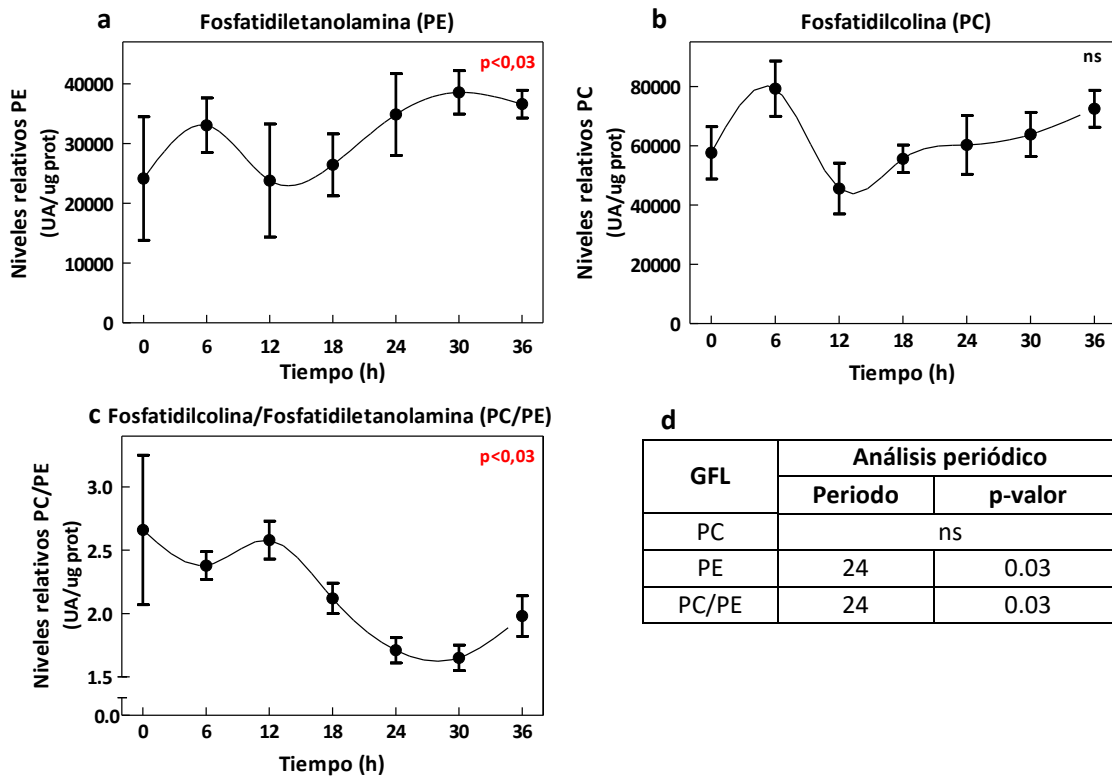


Figura 6: Variación temporal del contenido lipídico en células T98G sincronizadas. El análisis estadístico reveló una oscilación significativa para los niveles relativos de PE (a) y PC/PE (c) con un periodo de 24 h (d; COSINOR, $p < 0.03$; $n = 3$ experimentos). Los niveles de cada GFL (eje y) se expresa como unidades arbitrarias (UA) por μg de proteínas totales.

Considerando las oscilaciones temporales en la marcación metabólica de GFLs en células T98G previamente evidenciadas en el laboratorio y los resultados presentados en esta sección, podemos sugerir un control temporal por parte del reloj biológico sobre el metabolismo de GFLs con periodos cercanos a las 24 h.

3.2.2.2 Determinación de la actividad total de la enzima fosfohidrolasa de ácido fosfatídico

El ácido fosfatídico, precursor de todos los GFLs, es desfosforilado a DAG mediante la actividad de la enzima fosfohidrolasa de ácido fosfatídico (PAP) para sintetizar PC y PE [131] (*Ilustración 9*). Considerando el rol clave de la enzima PAP en proveer DAG tanto para la biosíntesis de GFLs como de TAG, nos enfocamos en evaluar la actividad de esta enzima desde el punto de vista cronobiológico. Para ello, homogenatos cosechados a distintos horarios post-sincronización fueron incubados con $[^3\text{H}]\text{-PA}$ y la actividad de la enzima PAP se determinó cuantificando la liberación de $[^3\text{H}]\text{-DAG}$

producido. La Figura 7 muestra que el perfil de actividad *in vitro* de la enzima estudiada presenta una ritmicidad significativa con un periodo de 30 h para la condición de arresto parcial y de 24 h para la condición de proliferación (RAIN-COSINOR, $p < 0.03$). Los mayores niveles de actividad para las células arrestadas fueron observados a los tiempos 18, 24 y 30 h post-sincronización y sus menores niveles al tiempo 12 h. La comparación de pares mediante el test de Duncan evidenció que los niveles encontrados al tiempo 30 h difieren del tiempo 12 h en la condición de arresto parcial. En el caso de las células en proliferación, los niveles de actividad fueron mayores principalmente 24 h post-sincronización los cuales difieren de aquellos encontrados a las 12 h.

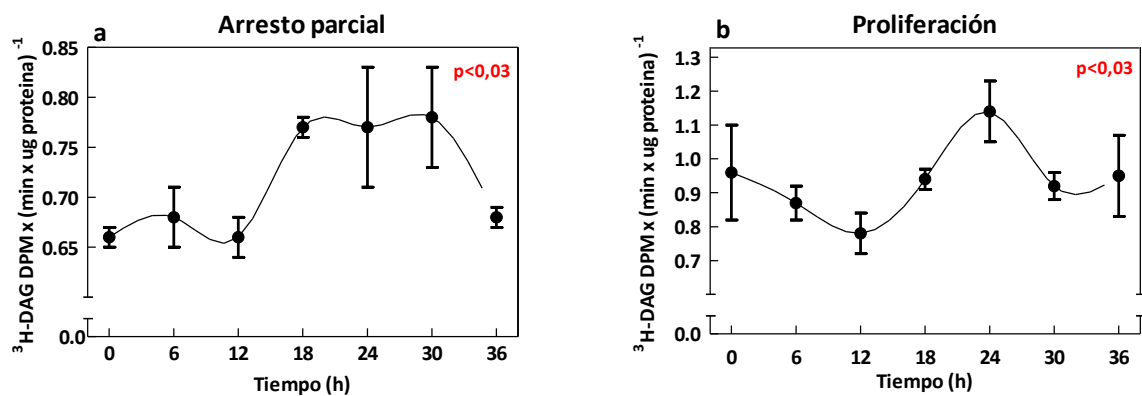


Figura 7: Variación temporal de la actividad *in vitro* de la enzima PAP en células T98G sincronizadas. La actividad de la enzima PAP fue determinada en homogenatos de células T98G sincronizadas a distintos tiempos post-sincronización. El análisis estadístico reveló una variación temporal significativa para la actividad *in vitro* de la enzima ($^3\text{H-DAG DPM}/\text{min} \times \mu\text{g proteínas totales}$) con un periodo de 30 y 24 h para la condición **arresto parcial** (a) y **proliferación** (b), respectivamente ($p < 0.03$ RAIN-COSINOR; $n = 2$ experimentos).

Cabe destacar que, en la condición proliferativa, la mayor actividad *in vitro* de la enzima PAP registrada al t_{24} post-sincronización se condice con los resultados obtenidos en el laboratorio durante la beca post-doctoral del Dr. Lucas Sosa-Alderete, en los cuales se observó en tal horario mayores valores de marcación metabólica. Resultados similares coincidieron en el t_{12} en los cuales se evidenciaron menores niveles de actividad *in vitro* de la enzima PAP y bajos niveles de marcación metabólica.

3.2.2.3 Determinación de los niveles de las especies reactivas del oxígeno

Con el objetivo de investigar el reloj metabólico/redox en la línea celular en estudio, se evaluó el estado redox en células T98G sincronizadas y mantenidas en arresto parcial o proliferación. Luego de la sincronización, las células fueron cosechadas cada intervalos de 6 h durante 36 h e incubadas con la sonda 2'-7'-Diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFH-DA) ($2 \mu\text{M}$) durante 40 min a 37°C .

Las esterasas intracelulares clivan al compuesto DCFH-DA en los dos enlaces éster, produciendo un compuesto relativamente polar e impermeable a la membrana celular, H₂DCF. Esta molécula no fluorescente se acumula intracelularmente y luego de la oxidación produce altas cantidades del producto fluorescente 2'-7'-dicloro-fluoresceína (DCF). De esta manera, el estado redox de la muestra puede ser monitoreada mediante citometría de flujo a 530 nm cuando la muestra es excitada a 484 nm [261]. La intensidad de fluorescencia analizada reveló una variación temporal significativa en el estado redox en ambas condiciones de crecimiento (K-W, $p < 0.01$) con un periodo de 12 h en cada situación (COSINOR, $p < 0.008$) (Fig. 8).

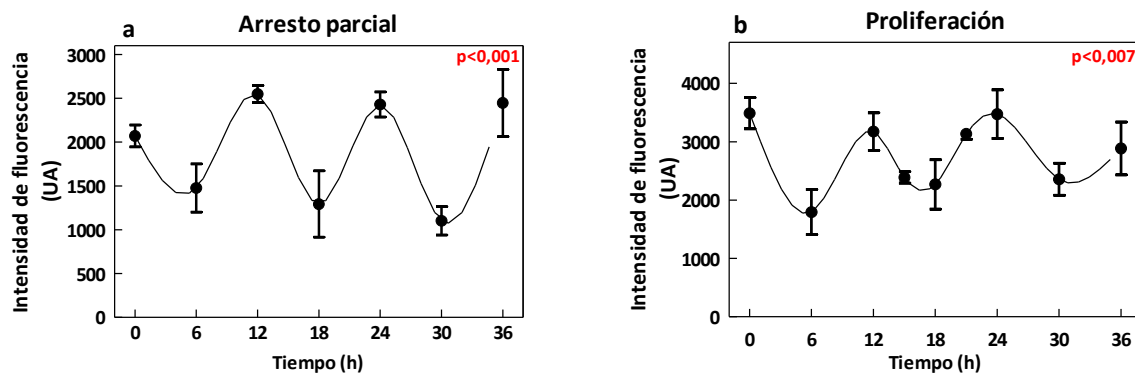


Figura 8: Variación temporal del estado redox en células T98G. Luego de la sincronización, las células fueron mantenidas en ausencia (**arresto parcial**, a) o presencia de SFB (**proliferación**, b) y cosechadas cada 6 h durante 36 h. El estado redox utilizando la sonda (DCFH-DA) reveló una oscilación temporal significativa con un periodo de 12 h para ambas condiciones de cultivo (COSINOR, $p < 0.008$; $n = 3-4$ experimentos). El estado redox se expresó como intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias, UA).

Luego de corroborar que el estado redox en las células T98G en proliferación muestra variaciones temporales con periodo de 12 h, nos focalizamos en evaluar si el reloj molecular podría estar vinculado en la regulación temporal del metabolismo redox en estas células. Para tal fin, se analizó el estado redox como fue descrito en el párrafo anterior en la población de células T98G luego de ser transfectadas con el plásmido PX459-*Bmal1* (T98G E1), que posee alterada la expresión del gen reloj *Bmal1*. Bajo esta condición, la amplitud del ciclo de 12 h en el estado redox fue sustancialmente disminuida y el ritmo de 12 h se extendió a 18 h (COSINOR, $p < 0.02$) (Fig. 9), evidenciando una importante interacción entre el reloj molecular y el estado redox de la célula comandado por el oscilador metabólico/redox.

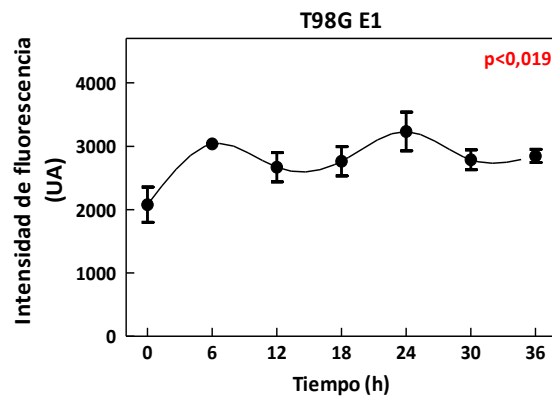


Figura 9: Variación temporal del estado redox en la población T98G E1. El estado redox en la población de células T98G E1 se analizó utilizando la sonda (DCFH-DA) mediante citometría de flujo. Los resultados revelaron una oscilación temporal en la intensidad de fluorescencia con un periodo de 18 h (COSINOR, $p < 0.02$; $n = 3$ experimentos). El estado redox se expresó como intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias, UA).

3.2.2.4 Ciclo de reducción y oxidación de peroxirredoxinas

En distintos dominios filogenéticos se ha demostrado que los ciclos de oxidación y reducción de las proteínas peroxirredoxinas (PRX) presentan oscilaciones temporales a fin de contrarrestar la producción tóxica de ROS con un periodo cercano a las 24 h, aun en modelos de estudio que no presentan mecanismos transcripcionales [116]. Tales evidencias sugieren que las PRX podrían postularse como marcadores circadianos universales con amplia conservación filogenética.

En nuestro modelo de estudio, los niveles de abundancia de las proteínas PRX en su forma PRX-SO_{2/3} fueron analizados mediante Western Blot. Para ello, se cosecharon homogenatos de células T98G mantenidas en arresto parcial o proliferación a distintos horarios post-sincronización y se analizó la abundancia de las PRX utilizando un anticuerpo dirigido hacia el sitio activo de tales enzimas en su estado oxidado (PRX-SO_{2/3}).

Los resultados indicaron que la abundancia de las proteínas PRX-SO_{2/3} muestran una variación temporal significativa en ambas condiciones de crecimiento (K-W, $p < 0.05$) con un periodo aproximado de 24 h en células arrestadas (RAIN, $p = 0.054$) o 30 h en células proliferativas (RAIN, $p < 0.00002$). En células arrestadas, los niveles de PRX-SO_{2/3} fueron mayores a 24-30 h mientras que, en células proliferativas, los niveles de PRX exhibieron mayores niveles a 12 y 24-30 h. A continuación, se muestra un blot representativo de algunos horarios evaluados de cada condición y la cuantificación de los experimentos realizados.

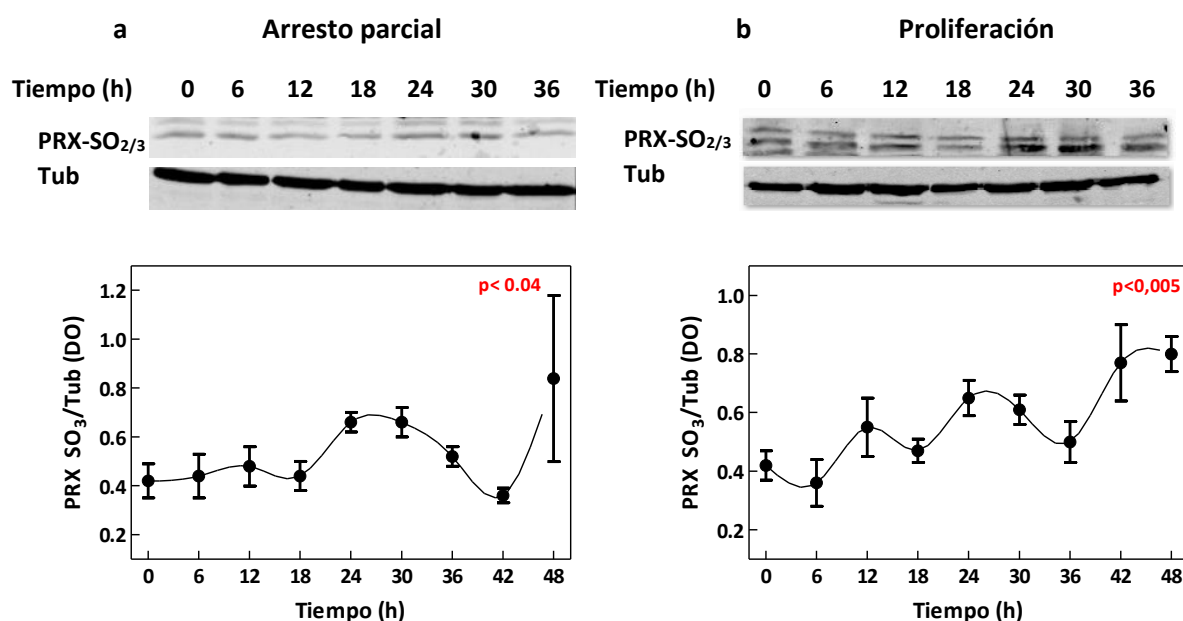


Figura 10: Variación temporal en la expresión de peroxirredoxinas. Las proteínas extraídas de células T98G cultivadas en ausencia (**arresto parcial**, a) o presencia de SFB (**proliferación**, b) fueron analizadas mediante Western Blot observándose una variación temporal significativa en la abundancia de las proteínas PRX-SO_{2/3} en ambas condiciones de crecimiento (K-W, $p < 0.05$; $n = 3-4$ experimentos) con un periodo de 24 y 30 h para la condición arresto y proliferación, respectivamente (RAIN, $p < 0.05$). Los niveles de PRX-SO_{2/3} fueron expresados como densidad óptica (DO) normalizados por el control de carga Tubulina (Tub).

Considerando el rol de detoxificación de las proteínas PXR podríamos plantear la siguiente relación para células en proliferación: la mayor abundancia de las mismas coincide con altos niveles de ROS (t_{12} , t_{24}). A su vez, los tiempos t_6 y t_{18} que presentan menores niveles de ROS coinciden con los menores niveles de abundancia de las PRX. De todos modos, otros sistemas antioxidantes pueden también estar actuando en las células a otros horarios.

3.2.3 Susceptibilidad de células T98G al tratamiento con drogas antitumorales

Luego de evidenciar oscilaciones temporales en distintos procesos metabólicos en células T98G sincronizadas y mantenidas en proliferación, nos focalizamos en evaluar si existen estadios diferenciales en las células tumorales en los cuales sean más susceptibles a drogas antitumorales. En primer lugar, evaluamos la susceptibilidad al quimioterapéutico **Bortezomib** (BOR), un potente inhibidor de proteosoma utilizado en la clínica [276]; y posteriormente, utilizamos un agonista del gen reloj REV-ERB (**SR9009**) para evaluar los efectos sobre la viabilidad y metabolismo de células T98G.

3.2.3.1 Susceptibilidad al tratamiento con Bortezomib

El objetivo de esta serie de experimentos es evaluar si las células T98G responden de manera diferencial al tratamiento con BOR dependiendo del momento post-sincronización en el cual se

administra el quimioterapéutico. Para tal fin, las células T98G sincronizadas y mantenidas en proliferación fueron tratadas con BOR (500 nM) a cada uno de los tiempos post-sincronización durante 36 h. Considerando un 100% de viabilidad aquellas células incubadas con DMSO (vehículo de la droga), evidenciamos una respuesta diferencial en el tiempo en la susceptibilidad al tratamiento con la droga con menores niveles de viabilidad en una ventana de tiempo desde las 12 a 24 h (Fig. 11). El análisis estadístico mostró un efecto significativo del tiempo, tratamiento e interacción (ANOVA, $p < 0.0001$) con máxima viabilidad a los tiempos 6 y 30 h luego de la sincronización, los cuales difieren de todos los demás tiempos examinados. El análisis periódico COSINOR reveló que la oscilación observada presenta un periodo de 30 h ($p < 0.01$).

Posteriormente, se diseñaron una serie de experimentos para evaluar si el reloj molecular posee algún efecto sobre la respuesta diferencial al tratamiento con BOR. Para ello, se realizó el mismo protocolo de tratamiento en la población de células T98G E1 transfectadas con el plásmido PX459-*Bmal1*. Si bien la variación temporal y su amplitud no fueron alteradas en las células T98G E1 (K-W, $p < 0.0013$), la oscilación exhibió un marcado adelanto de fase de 6 h con los menores niveles de viabilidad celular a las 6 y 12 h luego de la sincronización (Fig. 11).

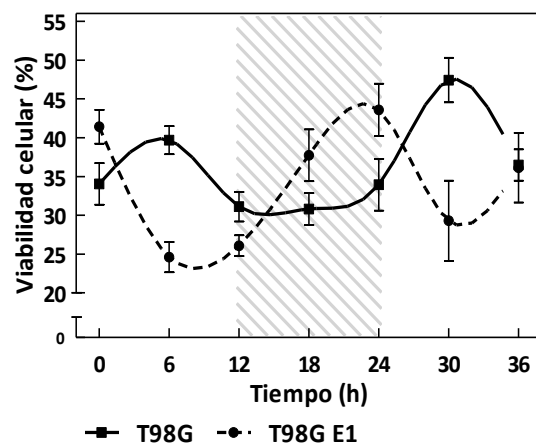


Figura 11: Respuesta diferencial al tratamiento con BOR en células T98G. Las células T98G (línea continua) o T98G E1 (línea punteada) fueron tratadas con BOR a cada uno de los tiempos post-sincronización durante 36 h y posteriormente, se midió la viabilidad celular. Para ambas poblaciones, el análisis estadístico reveló variaciones temporales significativas evidenciando un adelanto de fase de 6 h para la población de células T98G E1 (K-W, $p < 0.0013$; $n = 2$ experimentos) en relación a las células T98G (ANOVA, $p < 0.0001$; $n = 3$ experimentos). La viabilidad celular fue expresada como porcentaje considerando un 100% de viabilidad aquellas células incubadas con el vehículo de la droga (DMSO).

Cabe destacar que en los tiempos t_{12} y t_{24} post-sincronización en los cuales se registraron altos niveles de ROS (Fig. 8b) se correlacionan con mayor susceptibilidad al tratamiento con BOR, evidenciando de esta manera un posible vínculo entre el estado redox de la célula al momento en el cual se realiza la administración del quimioterapéutico y la susceptibilidad a la droga.

Teniendo en cuenta esta correlación, nos preguntamos si los niveles de ROS podrían estar vinculados en el proceso de muerte celular desencadenado por el tratamiento con BOR. Para ello, células T98G fueron incubadas con BOR (500 nM) durante 24 h y posteriormente, se evaluó el estado redox mediante citometría de flujo como fue descrito anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.

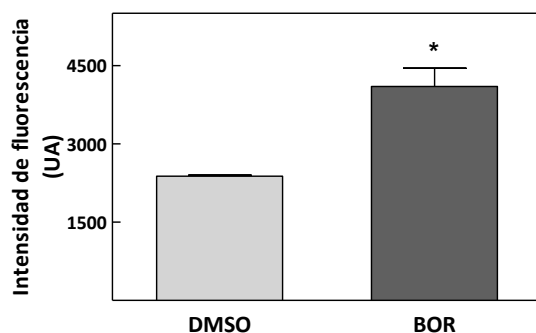


Figura 12: Niveles de ROS en células tratadas con BOR. Las células T98G fueron incubadas con BOR (500 nM) durante 24 h, y posteriormente, se analizó el estado redox mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron una diferencia significativa con mayores niveles de ROS en las células tratadas con BOR respecto a las células incubadas con el vehículo de la droga (DMSO) (t-test, $p < 0.04$; $n = 2$ experimentos). Los niveles de ROS fueron expresados como intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias, UA).

Como puede observarse en la Figura 12, las células incubadas previamente con BOR presentan mayores niveles de ROS en relación a las células control incubadas con DMSO (t-test, $p < 0.04$).

3.2.3.2 Susceptibilidad al tratamiento con SR9009

Trabajos publicados por otros grupos de investigación revelaron que, ligandos sintéticos que actúan como agonistas del gen reloj *Rev-erba*/ β poseen actividad antiproliferativa tanto en células en cultivo como en modelos *in vivo* [240, 277], sugiriendo que la modulación farmacológica de la maquinaria circadiana podría ser una efectiva estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer. Por tales evidencias, se propuso evaluar los efectos del agonista SR9009 sobre la viabilidad y metabolismo de células T98G.

En primer lugar, las células T98G fueron tratadas con el agonista SR9009 a una concentración final de 10, 20 y 40 μM durante 24, 48 o 72 h, y finalmente se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT como fue descrito en Materiales y Métodos. Se consideró 100% de viabilidad aquellas células incubadas con el vehículo de la droga (DMSO). Los resultados presentados en la Figura 13 demuestran un efecto significativo sobre la viabilidad celular luego de incubar las células T98G con concentraciones del agonista de 20 μM y 40 μM durante 48 o 72 h.

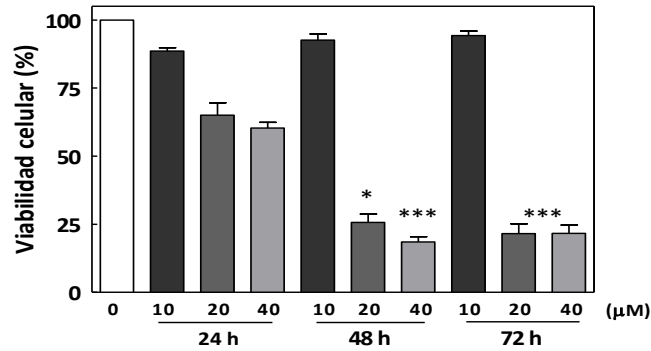


Figura 13: Viabilidad de células T98G tratadas con el agonista SR9009. Las células T98G fueron tratadas con concentraciones crecientes del agonista SR9009 (10, 20 y 40 μM) durante 24, 48 y 72 h. Mediante el ensayo de MTT se determinó la viabilidad celular evidenciando efectos significativos sobre la viabilidad de células T98G a concentraciones de 20 y 40 μM durante 48 o 72 h (ANOVA, $p < 0.0001$). Los niveles de viabilidad celular fueron expresados como porcentaje considerando un 100% de viabilidad aquellas células incubadas con el vehículo de la droga (DMSO).

Luego de evidenciar efectos antiproliferativos del agonista SR9009 en las células T98G, se planteó evaluar si estas células exhiben respuestas diferenciales en el tiempo al tratamiento con dicha droga. Para ello, las células T98G sincronizadas y mantenidas en proliferación fueron tratadas con el agonista SR9009 (20 μM 48 h) a cada uno de los tiempos post-sincronización. Considerando un 100% de viabilidad aquellas células incubadas sólo con DMSO, se evidenció una respuesta diferencial en el tiempo en la susceptibilidad al tratamiento con la droga. El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre la viabilidad observada al t_{18} (mayor susceptibilidad) y los t_{6-12} (menor susceptibilidad) post-sincronización (K-W, $p < 0.0041$).

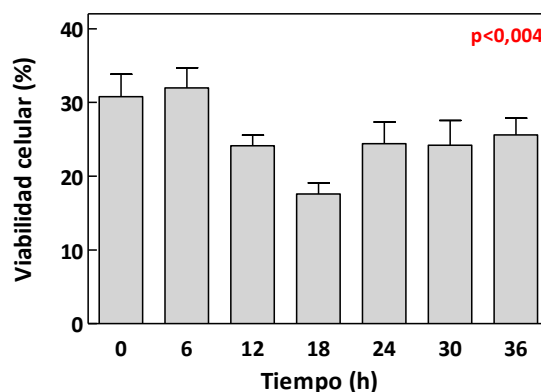


Figura 14: Respuesta diferencial al tratamiento con SR9009 en células T98G. Las células T98G fueron tratadas con SR9009 (20 μM) a cada uno de los tiempos post-sincronización durante 48 h y posteriormente, se midió la viabilidad celular por MTT. El análisis estadístico reveló variaciones temporales significativas en la viabilidad celular (K-W, $p < 0.0041$; $n = 3$ experimentos). Los resultados fueron expresados como porcentaje considerando el 100% de viabilidad aquellas células incubadas con el vehículo de la droga (DMSO).

Con el objetivo de visualizar la morfología de las células T98G luego del tratamiento con el agonista, se evaluó la expresión de la proteína reloj REV-ERB y GFAP en células T98G previamente incubadas con SR9009 (20 μ M 48 h) mediante inmunocitoquímica. En la Figura 15, es posible observar los resultados obtenidos evidenciando cambios morfológicos y núcleos fragmentados con características apoptóticas en las células previamente incubadas con el compuesto SR9009.

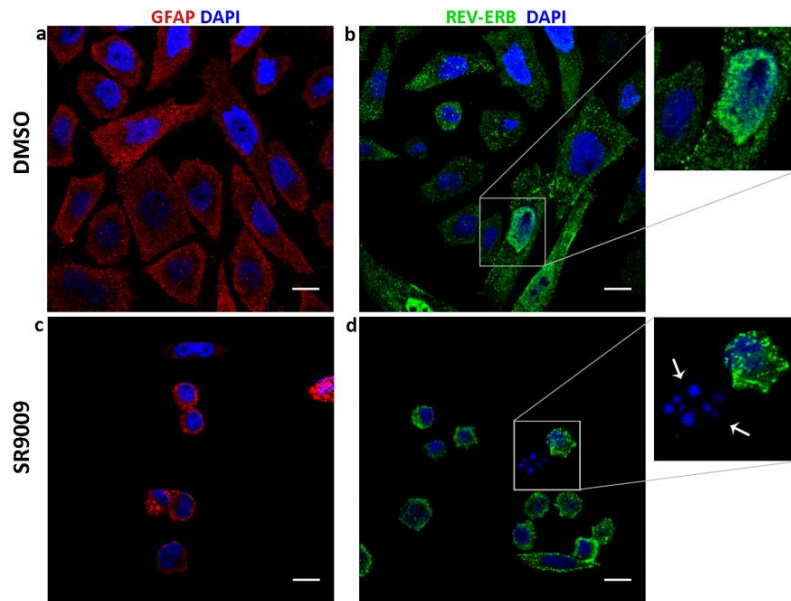


Figura 15: Expresión de REV-ERB y GFAP en células T98G control y tratadas con el agonista SR9009. Imágenes representativas de células T98G control (a-b DMSO) y tratadas con SR9009 (c-d, 20 μ M 48 h), en las cuales se observa la expresión de GFAP (rojo) y REV-ERB (verde) mediante ICC y microscopia confocal. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. La columna de la derecha muestra una ampliación de las fotomicrografías b y d. Las flechas blancas en la ampliación de la microfotografía d indica núcleos fragmentados con características apoptóticas. Barra=10 μ m.

3.2.3.2.1 Distribución del ciclo celular

Las células T98G control (DMSO, vehículo de la droga) y tratadas con SR9009 (20 μ M) fueron arrestadas durante 36 h en ausencia de SFB y posteriormente, estimuladas con 20% SFB durante 16 h. Las células cosechadas y fijadas como fue descrito en Materiales y Métodos, fueron analizadas mediante citometría de flujo y tinción con ioduro de propidio. Los resultados de la Figura 16 revelaron una mayor proporción de células T98G tratadas con el agonista en la fase G_0 - G_1 luego del estímulo respecto a las células control (t-test, $p < 0.0053$). Esto podría dar indicio que el agonista SR9009 altera la progresión del ciclo celular en células T98G, ya que luego del estímulo de SFB, aproximadamente un 60% de las células permanecen arrestadas en la fase G_0 - G_1 (Fig. 16 b-c).

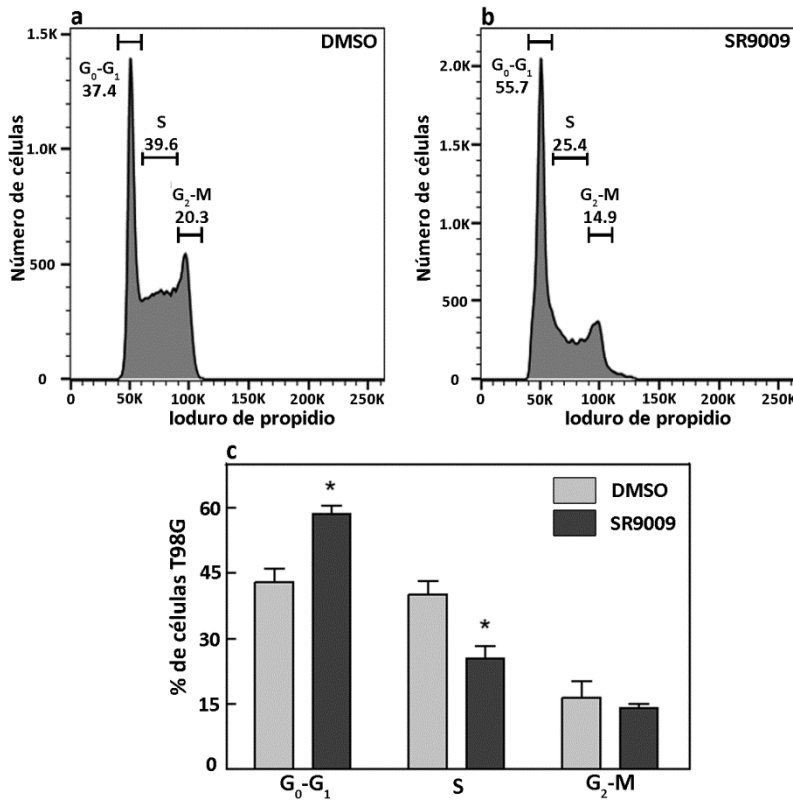


Figura 16: Distribución del ciclo celular en células T98G tratadas con el agonista SR9009.

Distribución representativa de células T98G control (a, DMSO) y tratadas con SR9009 (b, 20 μ M 48 h) teñidas con ioduro de propidio y analizadas por citometría de flujo. c) Cuantificación del porcentaje de células T98G de cada condición en las fases del ciclo celular evidenciando diferencias significativas para la fase G₀-G₁ y S de las muestras analizadas (t-test; fase G₀-G₁ p < 0.0053, fase S p < 0.01; n=3 experimentos).

3.2.3.2.2 Determinación de gotas lipídicas

Los componentes REV-ERBs tienen un rol crucial en la regulación del metabolismo como componentes circadianos que vinculan el oscilador transcripcional a la regulación de GCR involucrados en distintas vías metabólicas. Es por ello, que nos preguntamos si el tratamiento con estos agonistas altera, por ejemplo, el almacenamiento de lípidos en gotas lipídicas (GLs). Las GLs son organelas dinámicas de almacenamiento de lípidos presentes en la mayoría de las células eucariotas. Estas estructuras están constituidas de una monocapa de lípidos polares (fosfolípidos y colesterol) y proteínas que rodean un centro de lípidos neutros, triacilglicéridos y ésteres de colesterol.

A fin de evaluar los niveles de GLs, las células T98G control (DMSO) y tratadas con SR9009 (20 μ M 48 h) fueron fijadas e incubadas con el colorante Nile Red como fue descrito en Materiales y Métodos. Posteriormente, las imágenes fueron adquiridas por microscopía confocal y se analizó el tamaño de tales estructuras utilizando el software *ImageJ*. Como puede observarse en la Figura 17, las células tratadas con el agonista SR9009 presentan GLs con un tamaño promedio mayor que las células control evidenciando una diferencia significativa en el parámetro evaluado (t-test, p < 0.003).

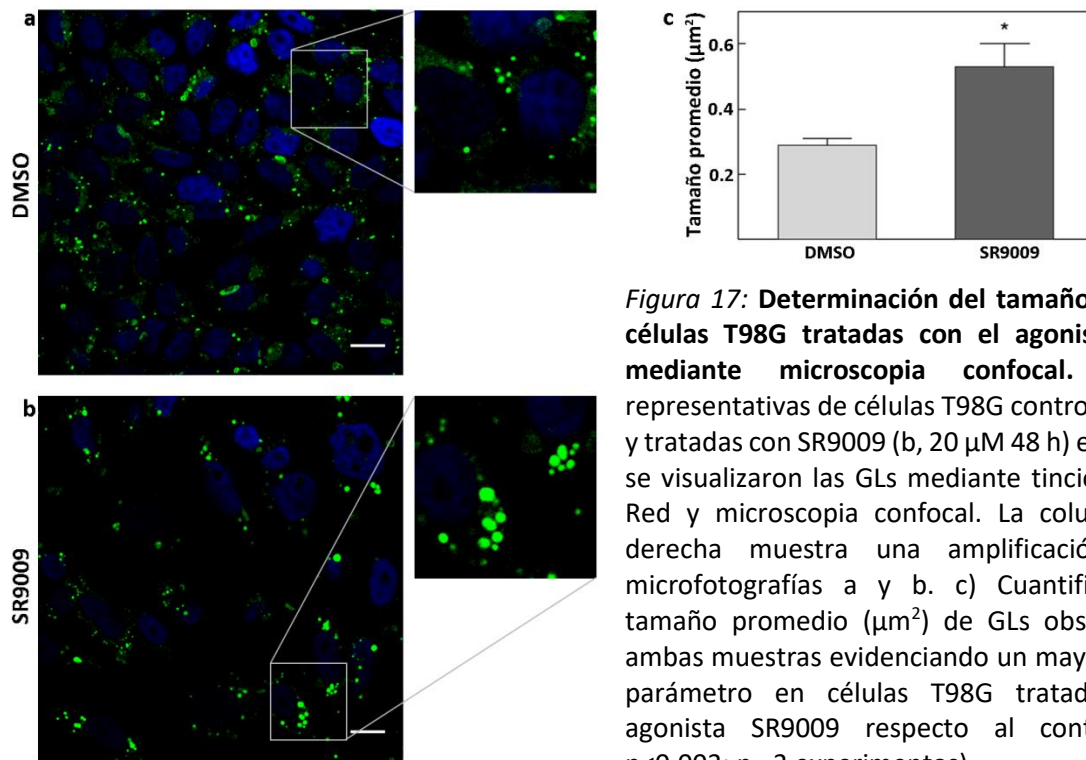


Figura 17: Determinación del tamaño de GLs en células T98G tratadas con el agonista SR9009 mediante microscopia confocal. Imágenes representativas de células T98G control (a, DMSO) y tratadas con SR9009 (b, 20 μM 48 h) en las cuales se visualizaron las GLs mediante tinción con Nile Red y microscopia confocal. La columna de la derecha muestra una ampliación de las microfotografías a y b. c) Cuantificación del tamaño promedio (μm²) de GLs observadas en ambas muestras evidenciando un mayor valor del parámetro en células T98G tratadas con el agonista SR9009 respecto al control (t-test p<0.003; n= 3 experimentos).

Además de los análisis por microscopia confocal, es posible determinar los niveles de GLs mediante citometría de flujo cuantificando la intensidad de fluorescencia de GLs teñidas con Nile Red (Fig. 18).

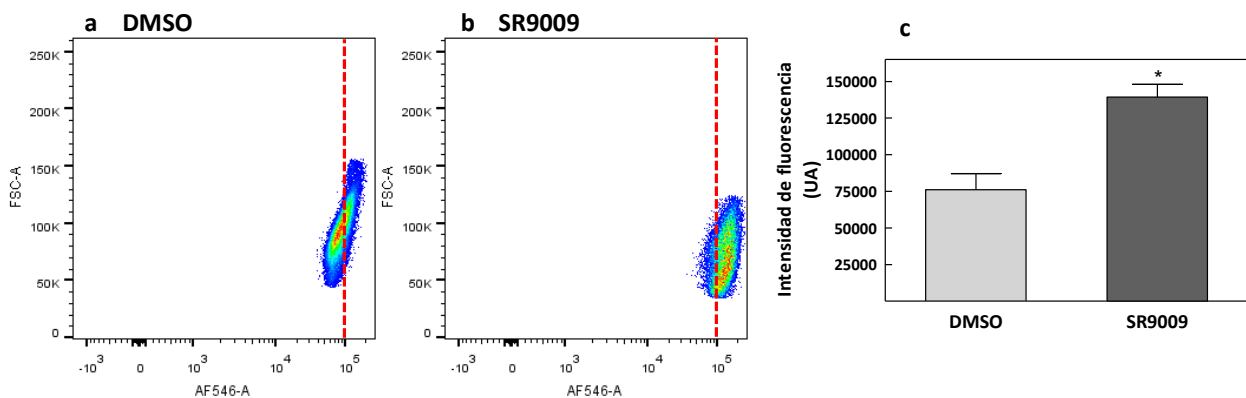


Figura 18: Determinación de la intensidad de fluorescencia de GLs en células T98G tratadas con el agonista SR9009 mediante citometría de flujo. Las GLs presentes en células T98G control (DMSO) y tratadas con SR9009 (20 μM 48 h) fueron teñidas con Nile Red y se analizó la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo. Histograma representativo de uno de los experimentos, en el cual se evidenció un corrimiento en el valor de intensidad de fluorescencia en la muestra tratada (b) respecto al control (a). c) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias, UA) de GLs en ambas muestras de células evidenciando un mayor valor del parámetro en células T98G tratadas con el agonista SR9009 respecto al control (t-test p<0.002; n= 3 experimentos).

Como puede observarse en la Figura 18, los resultados analizados con el software *FlowJo* (Fig. 18) revelaron un aumento significativo de intensidad de fluorescencia en las células tratadas con el agonista SR9009 respecto a las células control (t-test, $p < 0.002$).

En conjunto, estos resultados podrían sugerir que el tratamiento con el agonista SR9009 altera el almacenamiento lipídico, lo cual fue evidenciado por un mayor tamaño promedio e intensidad de fluorescencia de las GLs cuando las células T98G fueron previamente incubadas con SR9009.

3.2.3.2.3 Determinación de especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas altamente reactivas que funcionan como “mensajeros redox” en vías de señalización y regulación intracelular cuando se encuentran en concentraciones celulares apropiadas [278]. En niveles fisiológicos en exceso, ROS pueden inducir modificaciones oxidativas en otras especies de oxígeno, proteínas o lípidos resultando en daño y muerte celular [279]. Por tales motivos, nos planteamos estudiar si el tratamiento con el agonista SR9009 podría estar induciendo estrés oxidativo que preceda a la muerte celular. De esta forma, células T98G control (DMSO) y tratadas (SR9009 20 μ M 48 h) fueron incubadas con una sonda fluorescente para detectar ROS, como fue descrito en Materiales y Métodos.

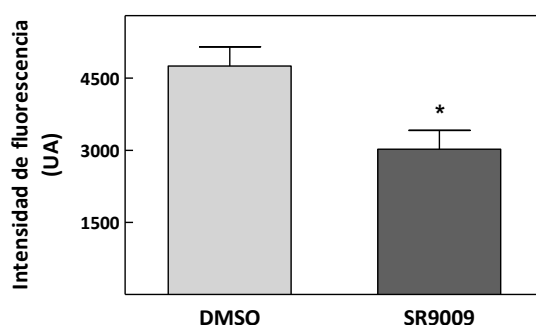


Figura 19: Determinación de ROS en células T98G tratadas con el agonista SR9009. En células T98G control (DMSO) y tratadas (20 μ M 48 h) se evaluó el estado redox mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron una diferencia significativa entre las muestras estudiadas evidenciando menores niveles de ROS en las células tratadas con el agonista (t-test, $p < 0.01$; $n = 3$ experimentos). Los niveles de ROS fueron expresados como intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias, UA).

Como puede observarse en la Figura 19, los resultados evidenciaron una reducción en ROS en células tratadas con el agonista respecto al control, sugiriendo que el estrés oxidativo no estaría involucrado en la muerte de la célula, al menos en las etapas investigadas.

3.3 DISCUSIÓN

El desequilibrio entre el sistema circadiano interno y el ambiente que nos rodea del mundo industrializado (iluminación artificial que prolonga la jornada de trabajo o estudio acortando las horas necesarias de sueño, los turnos rotativos de trabajo, y los viajes transmeridianos, entre diversas actividades características de la sociedad moderna), resulta en un aumento significativo en el riesgo de padecer enfermedades crónicas. Esta disrupción del reloj biológico endógeno con el medio ambiente externo repercute sobre distintos aspectos de la salud humana, incluyendo hipertensión, diabetes, enfermedades cardíacas, obesidad y mayor riesgo de cáncer. Considerando estos antecedentes y estudios previos de nuestro laboratorio, nos planteamos investigar si el reloj biológico es funcional en células T98G de glioblastoma humano, y de ser así, evaluar si hay horarios del día en que estas células cambien en su metabolismo, y sean más susceptibles a distintas drogas antitumorales.

En primer lugar, optimizamos un protocolo para obtener células T98G quiescentes y en proliferación capaces de ser sincronizadas por una señal extracelular, un *shock* de dexametasona (DEX), la cual demostró fortalecer la función del reloj circadiano en células B16 de melanoma [280]. La DEX, un glucocorticoide sintético y potente agente sincronizante ha sido ampliamente utilizada en modelos de cultivos celulares desde fibroblastos hasta astrocitos [281–283]. A su vez, la DEX es comúnmente usada en pacientes con GBM para reducir la inflamación o como adyuvante quimioterapéutico. Numerosos trabajos demuestran que células inmortalizadas pueden ser sincronizadas por múltiples señales (cambio de medio de cultivo, factores tróficos, suero, forskolina, shock térmico y glucocorticoides) desencadenando ritmicidad en la expresión génica [20, 42]. Estos protocolos de cultivo nos permiten investigar la función del sistema circadiano en células arrestadas o en proliferación mantenidas en cultivo a fin de imitar dos condiciones de crecimiento presentes en las células tumorales.

En nuestro modelo de estudio, observamos que, en la condición de arresto parcial la mayoría de las células se encontraban en la fase G_0/G_1 (aproximadamente 60-80%), mientras que un promedio mayor al 50% de las células en proliferación se encontraban en las fases S y G_2/M (Fig. 2). Tales distribuciones permanecieron aproximadamente constantes en los distintos horarios post-sincronización evaluados. Previamente, en nuestro laboratorio, se evidenció en condiciones de **arresto parcial** una expresión rítmica de ARNm evaluados con distintos periodos para los genes reloj (24-28 h, *Per1* y *Rev-erb*) y GCR (32 h, *ChoKa* y 16 h, *Pcyt-2*), mientras que la marcación metabólica de GFLs exhibió una ritmicidad con un periodo de 20 h en dicha condición.

Por el contrario, como puede observarse en los histogramas a continuación, células sincronizadas en la condición de **proliferación** perdieron la ritmicidad en la expresión de genes reloj y

GCR o registraron oscilaciones más cortas para el gen *Per1*. Resultados similares fueron evidenciados para la expresión de los genes *Per1* y *Per2* en gliomas [284]. No obstante, las células T98G en proliferación mantuvieron el perfil de oscilaciones diarias en la marcación total de GFLs, como también en la relación PC/PE con un periodo cercano a las 24 h.

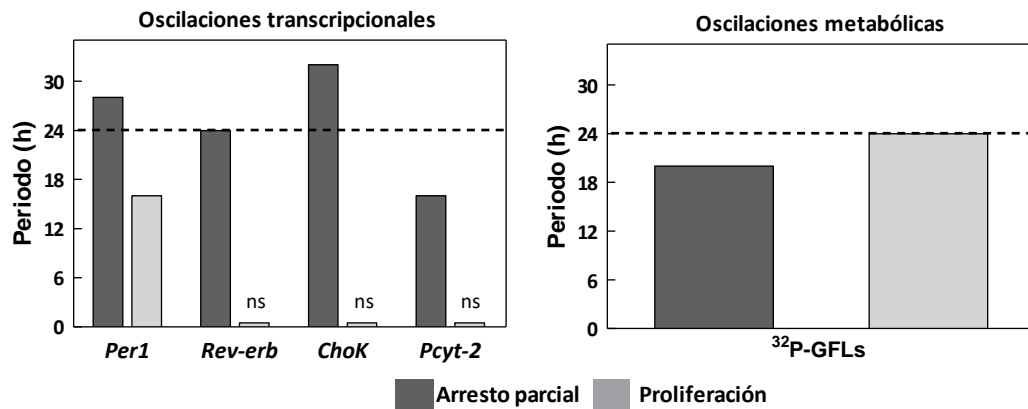


Figura 20: Periodos de oscilaciones transcripcionales y metabólicas en cultivos de células T98G. Las células sincronizadas y mantenidas en la condición de arresto parcial (gris oscuro) o en proliferación (gris claro) fueron recolectadas a diferentes horarios post-sincronización. En la figura se observan los periodos en horas para los ritmos en la expresión de ARNm de *Per1*, *Rev-erba*, *ChoK*, y *Pcyt2* (oscilaciones transcripcionales, panel izquierdo) y oscilaciones metabólicas en la marcación de GFLs totales (oscilaciones metabólicas, panel derecho). Tomado de Wagner y colaboradores [275].

Considerando estos resultados, nos planteamos investigar si las células T98G en proliferación poseen un oscilador metabólico que contribuya a la homeostasis de la célula aun cuando su circuito transcripcional circadiano se encuentre alterado bajo esta condición de cultivo. Para resolver este interrogatorio, estudiamos distintos parámetros del metabolismo lipídico (contenido frío de lípidos y actividad de enzima PAP) como también del estado redox de las células (niveles de ROS y ciclos de reducción/oxidación de PRX) bajo distintas condiciones de proliferación, los cuales discutiremos a continuación.

Oscilaciones metabólicas en células T98G

Diferentes trabajos de nuestro laboratorio y de otros grupos de investigación evidenciaron un vínculo estrecho entre el reloj circadiano molecular y el metabolismo de lípidos [22, 44, 139, 255, 285, 286]. En nuestro modelo de estudio, las células T98G en proliferación exhibieron fluctuaciones en la marcación de GFLs (post-doctorado del Dr. Lucas Sosa-Alderete) acompañadas en ambas condiciones proliferativas por cambios en la actividad de la enzima PAP (Fig. 7 de esta tesis), la cual provee DAG para la síntesis de GFLs más complejos (PC y PE) y TAG teniendo su máxima actividad a las 24 h. Cabe destacar la importancia de la función de la enzima PAP, dado que no sólo incluye la síntesis de GFLs,

sino que también está involucrada en transducción de señales de lípidos, regulación de la expresión génica, crecimiento de la membrana del retículo endoplásmico/nuclear, formación de gotas lipídicas y fusión y homeostasis de vacuolas [135, 265, 267, 287]. Al igual que los resultados obtenidos durante esta tesis para las células T98G sincronizadas, se ha demostrado que fibroblastos NIH3T3 crecidos a confluencia y sincronizados por un *shock* de suero exhiben oscilaciones temporales en los niveles de proteína de PER1. Más aún, estas variaciones se observaron en clara anti fase con las oscilaciones registradas en la marcación metabólica de GFLs y se perdieron cuando se silenció la expresión de PER1 o se analizó en células mutantes para la proteína CLOCK [44]. Estos resultados en combinación con los hallazgos obtenidos en la presente tesis, sugieren un complejo control temporal que involucra cambios en la expresión y/o actividad de enzimas específicas involucradas en el metabolismo de GFLs [44, 139, 255, 288]. Este control temporal con periodos cercanos a las 24 h podría estar reflejando importantes cambios temporales en las propiedades de la membrana (integridad, fluidez, curvatura) y biogénesis de nuevas membranas requeridas, por ejemplo, para la división celular, exocitosis, tráfico vesicular, y otros eventos específicos de cada tipo celular.

Posteriormente, nos propusimos evaluar el estado redox de las células T98G en relación a los niveles de ROS y los ciclos de reducción/oxidación de PRX. Se conoce que diferentes sistemas antioxidantes exhiben oscilaciones circadianas, como por ejemplo la glutatiónilación en el NSQ tiene su máximo a la noche y menores niveles durante el día, indicando un estado relativamente oxidado durante la fase activa/alimentación del periodo [289]. Por otro lado, diferentes estudios sugieren una posible relación entre la producción de ROS y la regulación de genes reloj [290]. Por ejemplo, macrófagos provenientes de ratones deficientes de BMAL1 presentan alteraciones en la producción de óxido nítrico [291], sugiriendo que componentes del reloj circadiano regulan procesos redox. A su vez, CLOCK y BMAL1 regulan directamente a NRF2 [292], un crítico factor de transcripción responsable de la producción de varias defensas antioxidantes. Si bien el mecanismo exacto de regulación es desconocido, estos hallazgos permiten establecer un vínculo estrecho entre el oscilador redox y la maquinaria transcripcional del reloj circadiano.

En nuestro modelo de estudio, hemos evidenciado oscilaciones significativas en el estado redox (niveles de ROS) y en la abundancia de las proteínas PRX-SO_{2/3} en ambas condiciones de cultivo, principalmente mostrando una ritmicidad bimodal a lo largo de las 24 h con periodos de 12 h en los niveles de ROS. Estos resultados coinciden con trabajos recientes apoyando la idea de un reloj de 12 h autónomo en mamíferos distinto al reloj transcripcional que coordina ritmos metabólicos y estrés [293].

Respecto a los ciclos de reducción/oxidación de PRX se sabe que constituyen un marcador universal de los ritmos circadianos desde humanos, moscas, hongos, bacterias y arqueas, reflejando

un estricto control temporal en respuesta a cambios oxidativos. Este mecanismo altamente conservado a través de la evolución, pudo haber conferido la habilidad para sobrevivir a los ciclos de estrés oxidativo y aparecer como respuesta al Gran Evento de Oxidación [111, 121]. En las células T98G, los ciclos de reducción/oxidación de PRX exhibieron un periodo de 24 h en la condición de arresto y 30 h en proliferación. Dado que las PRX tienen actividad de peroxidasa encargadas de la remoción de ROS, podríamos sugerir que cuando la célula posee altos niveles de ROS (t_{24}) es necesario maximizar la actividad de sistemas antioxidantes, lo que cual se correlaciona con altos niveles de PRX a las 24 h post-sincronización. Por otro lado, sería de esperar que otros sistemas antioxidantes (glutación, superóxido dismutasa, melatonina, etc.) puedan actuar en aquellos horarios en los cuales la expresión de las PRX se encuentre baja y los niveles de ROS sean altos [114].

Si bien los ciclos de PRX pueden persistir en ausencia de la maquinaria transcripcional requerida para coordinar el reloj molecular [111, 121], estudios realizados con modelos mutantes para los genes reloj evidencian una fase circadiana alterada en los ciclos de PRX respecto al control, sugiriendo de esta manera un fuerte vínculo entre el oscilador redox y el reloj circadiano. En este sentido, investigamos la interacción entre ambos osciladores en nuestro modelo de estudio, evaluando que efectos desencadena la disminución de la expresión de *Bmal1* en las células T98G en proliferación (T98G E1). Estas células expresan menores niveles de ARNm y proteína de su gen target *Per1* y no se registró una variación temporal significativa en los niveles de PER1. Bajo estas condiciones, se observó que las oscilaciones del estado redox (ciclos de 12 h en células T98G control) fueron sustancialmente disminuidas en su amplitud y el ritmo se extendió a un período de 18 h. Estos resultados apoyan la idea de que una alteración del circuito transcripcional circadiano de algún modo afecta al oscilador metabólico. Los resultados reportados sugieren la presencia de un oscilador metabólico funcional en células T98G involucrado en el metabolismo de GFLs, estado redox y ciclos de PRX operando con períodos desde 12 a 30 h.

Respuesta de células T98G a drogas antiproliferativas

En una segunda instancia, nos planteamos investigar si las oscilaciones metabólicas observadas podrían permitir establecer que la célula tumoral sea selectivamente tratada con mayor susceptibilidad a tiempos precisos luego de la sincronización usando, por ejemplo, el quimioterapéutico BOR. Esta droga es un inhibidor de proteosoma de dipéptido boronato capaz de inducir arresto en la fase G_2/M del ciclo celular y apoptosis. Sus efectos sobre la viabilidad celular también ha sido evidenciado en líneas celulares de origen glial [294] y está aprobado para el tratamiento de mieloma múltiple y linfoma non-Hodgkin [295] y en etapas avanzadas de GBM. En

células T98G en proliferación se evidenciaron importantes efectos antitumorales con los menores niveles de viabilidad celular entre los tiempos 12 y 24 h post-sincronización.

En conexión con estos resultados, células humanas y murinas de GBM han mostrado ritmos de bioluminiscencia en la expresión del *Bmal1*-luciferasa y una respuesta diferencial dependiente del tiempo al tratamiento con el quimioterapéutico Temozolomida (alquilante de ADN), comúnmente usando en pacientes con GBM. Este trabajo mostró que la inhibición del crecimiento tumoral fue mayor en el pico de expresión de *Bmal1*-luc [296]. Otros estudios también correlacionan una mayor sensibilidad a la irradiación en gliomas con una alta expresión de los genes *Per1* y *Per2* [284].

Dado que las células T98G en proliferación exhibieron un perfil oscilatorio aberrante en la expresión del ARNm del gen *Bmal1* (post-doctorado Dr. Lucas Sosa-Alderete), no sería posible plantear una correlación entre los niveles de este gen reloj y la susceptibilidad al BOR. No obstante, en base a nuestros resultados, es posible sugerir un cierto grado de correlación entre los niveles de ROS al momento de tratar las células con BOR y una mayor respuesta al tratamiento. Es así que, en los tiempos t_{12} y t_{24} post-sincronización donde se registraron altos niveles de ROS también se observó mayor susceptibilidad al quimioterapéutico BOR. Si bien la secuencia de eventos que conllevan a la apoptosis luego de la inhibición del proteosoma por BOR es desconocida, se postula que subproductos de procesos oxidativos celulares como ROS podrían estar involucrados en la iniciación de señalización de apoptosis. Al igual que nuestros resultados, niveles incrementados de ROS en células tratadas con BOR han sido evidenciados en células de cáncer colorrectal [297] y cáncer de pulmón de células no pequeñas H460 humanas [298] como también en células humanas de leucemia [299]. Estas observaciones apoyan aún más nuestros resultados mostrando que una mayor susceptibilidad al tratamiento con BOR puede alcanzarse en los momentos de altos niveles de ROS. Más aún, cuando se altera la expresión de *Bmal1*, la curva de susceptibilidad se ve afectada con un marcado cambio de fase, indicando la participación del activador transcripcional BMAL1 y otras proteínas reloj.

En los últimos años, se ha tratado de dilucidar la influencia de proteínas reloj en el crecimiento de células tumorales actuando como factores de transcripción en distintos puntos de control (*checkpoints*) del ciclo celular. Si bien diferentes estudios demuestran que una alteración del reloj circadiano o mutaciones en los genes reloj promueve el crecimiento tumoral [300–302], otros enfoques se centran en estudiar cómo la modulación farmacológica de componentes del reloj afecta la viabilidad de células tumorales al restringir vías activadas de forma aberrante en cáncer. Estos últimos enfoques hacen referencia al desarrollo de derivados de pirroles SR9009 y SR9011 [303] que actúan como agonistas específicos de los receptores REV-ERBs. Estos componentes del reloj no sólo actúan como represores del metabolismo lipídico sino que también en procesos involucrados en tumorigenesis e inflamación [160, 303–306]. Al igual que varios grupos de

investigación mostraron efectos citotóxicos del agonista SR9009 en células tumorales derivadas en cáncer de cerebro, mama, colon, melanoma y leucemia [240, 277], nuestros resultados evidencian efectos antiproliferativos del compuesto SR9009 en células T98G en proliferación alterando significativamente la progresión del ciclo celular.

La reprogramación del metabolismo lipídico ha sido observada en varios modelos tumorales [307], evidenciado por la sobreexpresión o activación de enzimas involucradas en la síntesis *de novo* de ácidos grasos, manteniendo de esta forma la lipogénesis activa [308]. En nuestro modelo de estudio, las células tratadas con el compuesto SR9009, exhibieron un aumento en el tamaño promedio e intensidad de fluorescencia de GLs teñidas con Nile Red. Considerando que los componentes REV-ERBs son represores del metabolismo lipídico, podríamos plantear que una alteración en la lipogénesis *de novo* estaría relacionada con esta situación. Si bien no tenemos evidencias directas para corroborar esta hipótesis, Bensaad y su grupo de investigación evidenciaron una acumulación de GLs debido a la captación de ácidos grasos dependiente de las proteínas FABP3/7 cuando la síntesis *de novo* está reprimida en hipoxia [309]. A su vez, Sulli y colaboradores reportaron que el tratamiento con los agonistas SR9009 y SR9011 reduce tanto el ARNm como los niveles de las enzimas ácido graso sintasa y esteroil-CoA desaturasa 1 claves y limitantes en la lipogénesis *de novo*, lo cual conlleva a una perturbación en varios ácidos grasos y fosfolípidos [240]. En este contexto, Guo y colaboradores postulan que la relación entre los GFLs de la monocapa y los lípidos neutros del centro podrían regular la morfología de las GLs; de este modo, cuando los GFLs son limitados (por ejemplo, en el *knockdown* de la enzima CTP:fosfolina citidiltransferasa), se induce la fusión de GLs para disminuir la relación superficie/volumen aumentando el tamaño de las mismas [151]. Una disminución del contenido de PC incrementa la cantidad relativa de PE en la monocapa, lo cual podría promover la fusión de GLs [310]. Por lo tanto, estos autores sugieren que la disponibilidad de PC es un regulador crucial del tamaño y número de GLs. Considerando que la PC es regulada por el reloj circadiano a través del circuito *Bmal1/Rev-erba/ChoKα* [139, 288], la deficiencia de PC podría ser una posible causa del aumento de tamaño de GLs que observamos en nuestro modelo. Resultados preliminares de nuestro laboratorio apoyan esta hipótesis al evidenciar una disminución en la expresión de la enzima ChoK en células T98G tratadas con el agonista SR9009. Asimismo, el grupo del Dr. Lacal y otros laboratorios, demostraron que esta enzima se encuentra sobre expresada en distintos tipos de cáncer, lo cual se correlaciona con los resultados encontrados en estos estudios [311].

A diferencia de los resultados obtenidos para el quimioterapéutico BOR, las células tratadas con el agonista SR9009 no evidenciaron aumento en los niveles de ROS. Estos resultados se condicen con experimentos realizados por Sulli y colaboradores quienes sugieren que la producción excesiva de ROS no estaría involucrada en la susceptibilidad a esta droga en células tumorales [240].

Considerando que los componentes REV-ERBs juegan un papel importante en varios procesos fisiológicos incluyendo la regulación de glucosa y metabolismo lipídico como también la regulación de los ritmos circadianos [312–314], podríamos proponer a estos agonistas como una prometedora estrategia para el tratamiento de células tumorales. Nuestros resultados en combinación con hallazgos de otros laboratorios generan perspectivas para estudiar a futuro de qué manera alteraciones en el metabolismo lipídico afectan la sobrevivencia de células tumorales.

RESUMEN GRÁFICO

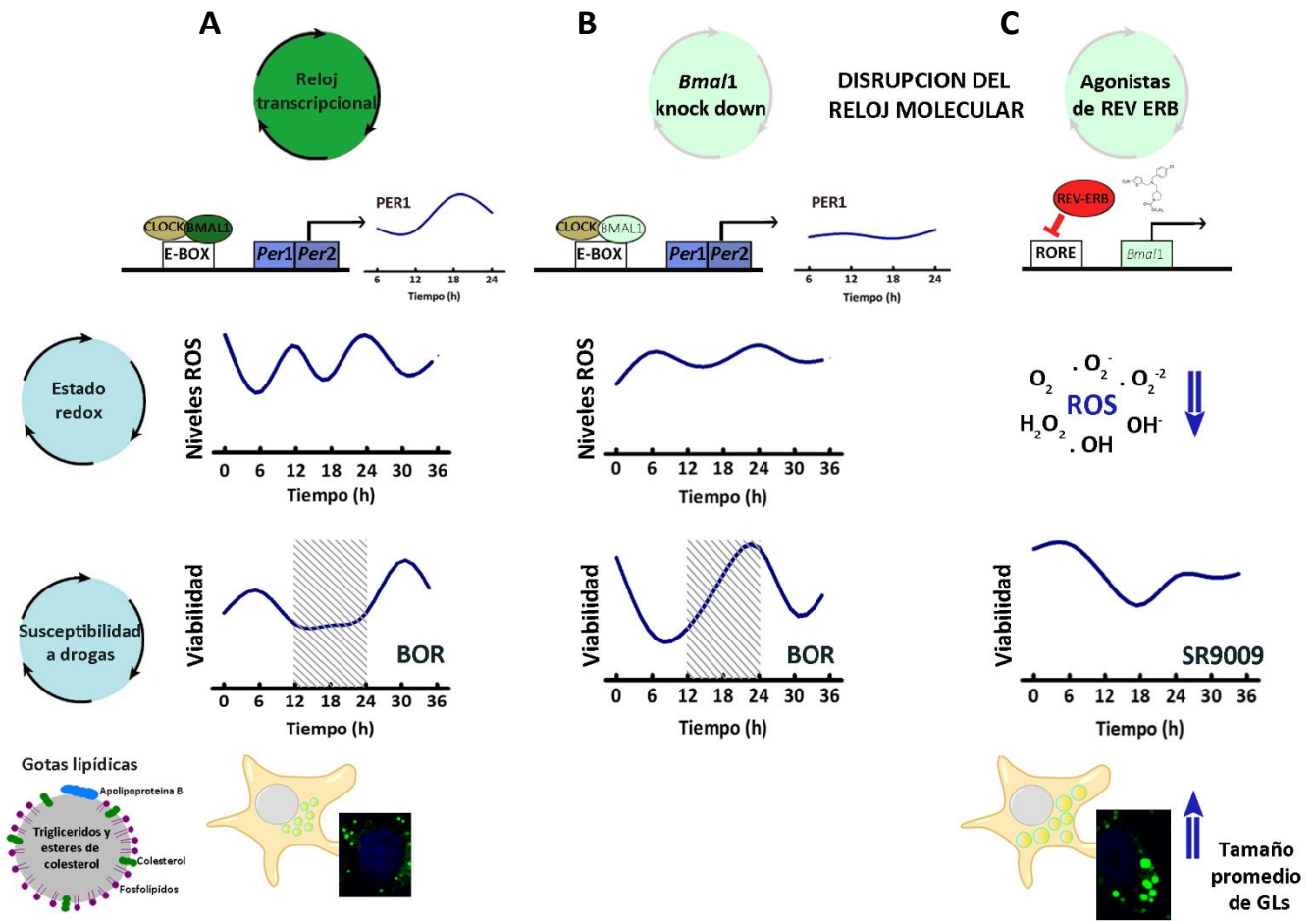
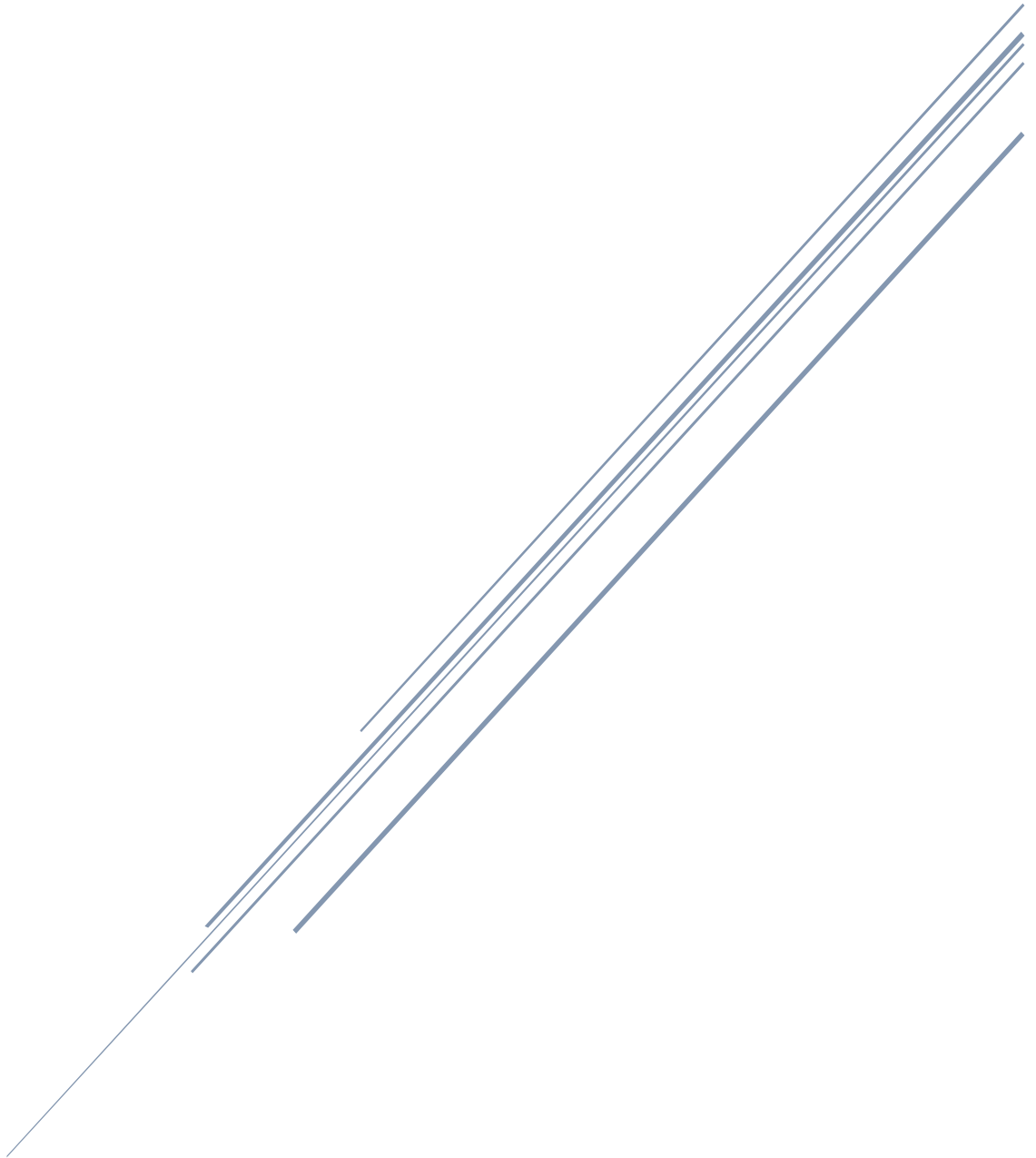


Figura 21: Esquema representativo de los resultados obtenidos en relación a las oscilaciones metabólicas y susceptibilidad a drogas antitumorales en células T98G en cultivo. En células T98G, se ha evidenciado una ritmicidad bimodal con periodos de 12 h en el estado redox de las células y una respuesta diferencial al tratamiento con Bortezomib con mayor susceptibilidad a la droga en una ventana de 12 a 24 h luego de la sincronización (A). Por el contrario, el periodo del estado redox de 12 h se extendió a 18 h con menor amplitud y un cambio de fase de 6 h en la susceptibilidad al tratamiento con Bortezomib en células T98G luego de alterar la expresión del gen reloj *Bmal1* (B). A su vez, las células T98G mostraron una respuesta diferencial al tratamiento con el compuesto SR9009 (agonistas de REV-ERBs) alterando la progresión del ciclo celular y el almacenamiento de lípidos en gotas lipídicas (C).

CAPITULO IV

Caracterización de células A530 y estudios *in vivo*



CAPÍTULO IV: CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS A530 EN CULTIVO Y ESTUDIOS *IN VIVO*

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar las células A530 en cultivo en función de sus proteínas reloj, estado redox y susceptibilidad al quimioterapéutico Bortezomib.
- Analizar la velocidad de crecimiento de tumores generados en ratones C57BL/6 mediante la inyección de células tumorales A530 de sistema nervioso periférico y B16 de melanoma a distintos horarios (día vs noche).
- Analizar la velocidad de crecimiento de tumores generados en ratones C57BL/6 mediante la inyección de células A530 que poseen alterada la expresión de *Bmal1* (A530 A5) en comparación con su grupo control.
- Evaluar el efecto del quimioterapéutico Bortezomib a distintos horarios (día vs noche) en tumores generados a partir de la inyección de células A530 en ratones C57BL/6.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Caracterización de las células A530 en cultivo

Las células A530 fueron aisladas a partir de tumores malignos de la vaina del nervio periférico de ratones NPcis (*Nf1*^{+/-} *Trp53*^{+/-}) en el laboratorio de la Dra. Beatriz Caputto (CIQUIBIC-CONICET). Los ratones NPcis contienen una mutación KO en los genes *Trp53* (p53) y *Nf1* en la misma copia del cromosoma 11 (en "cis"). La copia restante de estos genes en el cromosoma 11 opuesta es WT. Dado que todas las células de los ratones NPcis son mutantes para una copia de los genes *Nf1* y *Trp53*, existe una alta probabilidad de la pérdida espontánea de las copias WT de ambos genes y en consecuencia, los ratones se vuelven muy propensos a desarrollar tumores dando lugar a astrocitomas malignos y glioblastoma [257, 258]. Tales células tienen la capacidad de crecer en suspensión sin inhibición por contacto y formar esferas y acúmulos típicos de células malignas.

En una primera instancia las células A530 fueron caracterizadas en cultivo, y posteriormente, fueron inyectadas en ratones C57BL/6 a fin de evaluar su velocidad de crecimiento bajo distintas condiciones experimentales. Para los experimentos en cultivo, las células fueron sincronizadas mediante cambio de medio de cultivo (t_0) y recolectadas cada intervalo de 6 h durante 36 h para posteriores ensayos.

Como se observa a continuación (Fig. 22), las células A530 en cultivo expresan típicos marcadores gliales como vimentina, proteína fibrilar ácida glial (GFAP) y glutamina sintasa (GS).

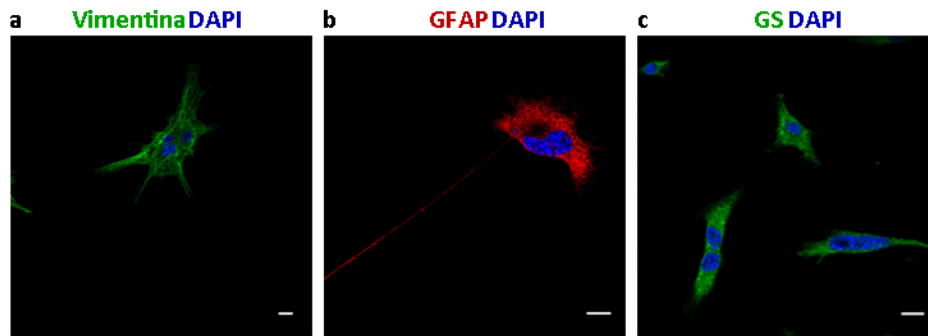


Figura 22: Expresión de marcadores gliales en células A530. Imágenes representativas de microscopía confocal de células A530 en cultivo expresando típicos marcadores de origen glial como vimentina (a), proteína fibrilar ácida glial (GFAP, b) y glutamina sintasa (GS, c). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra=10 µm.

Como se describió anteriormente, los ratones NPcis pierden progresivamente su copia WT de los genes supresores *Nf1* y *Trp53* y generan espontáneamente tumores en sistema nervioso central y periférico. A fin de evaluar la pérdida de la copia WT de tales genes, se extrajo ADN genómico a partir de ratones C57BL/6 (homocigotas para *Nf1* y *Trp53*) y células A530 en cultivo. Los *primers*, el patrón de bandas y las condiciones de amplificación utilizadas fueron detallados en Materiales y Métodos. Como puede observarse en la Figura 23, la muestra amplificada a partir del ADN genómico de células A530 presentó el patrón de bandas y peso molecular esperado para la copia mutante de los genes *Nf1* y *Trp53* y evidenció la pérdida de la copia WT de ambos genes.

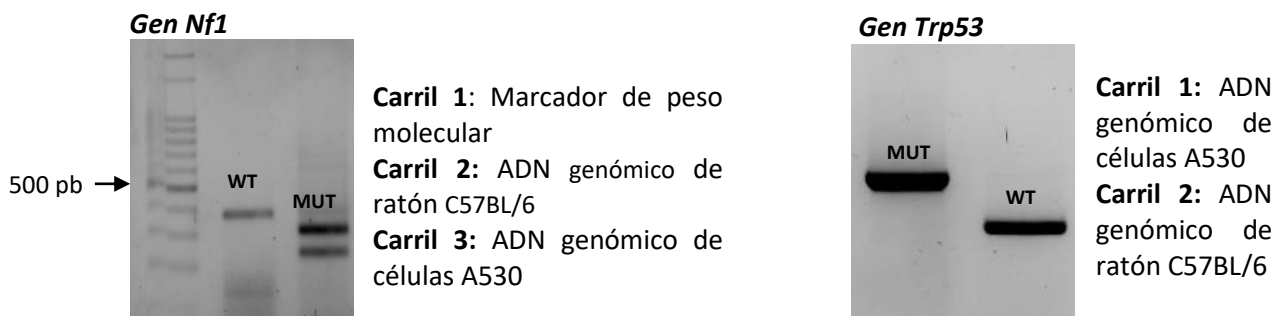


Figura 23: Perfil genómico de los genes supresores *Nf1* y *Trp53* en células A530. El ADN genómico de las células A530 y ratones C57BL/6 fue extraído mediante hidrólisis básica. Las muestras amplificadas con *primers* específicos fueron analizadas mediante un gel de agarosa evidenciando la pérdida de las copias WT de los genes *Nf1* (374 pb) y *Trp53* (450 pb) en las células A530. A su vez, se observaron amplicones correspondientes al patrón de bandas esperado para las copias mutantes de los genes *Trp53* (850 pb) y *Nf1* (274 pb y una banda menor) en las células A530.

4.2.1.1 Variaciones temporales en la expresión de BMAL1 y PER1

A fin de evaluar si las células A530 en cultivo presentan variaciones temporales en las proteínas reloj, se evaluaron los niveles de la proteína BMAL1 y PER1 mediante inmunocitoquímica. Para ello, células cultivadas en cubreobjetos fueron fijadas a distintos horarios post-sincronización e incubadas con el anticuerpo primario específico que reconoce a BMAL1 o PER1. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 24.

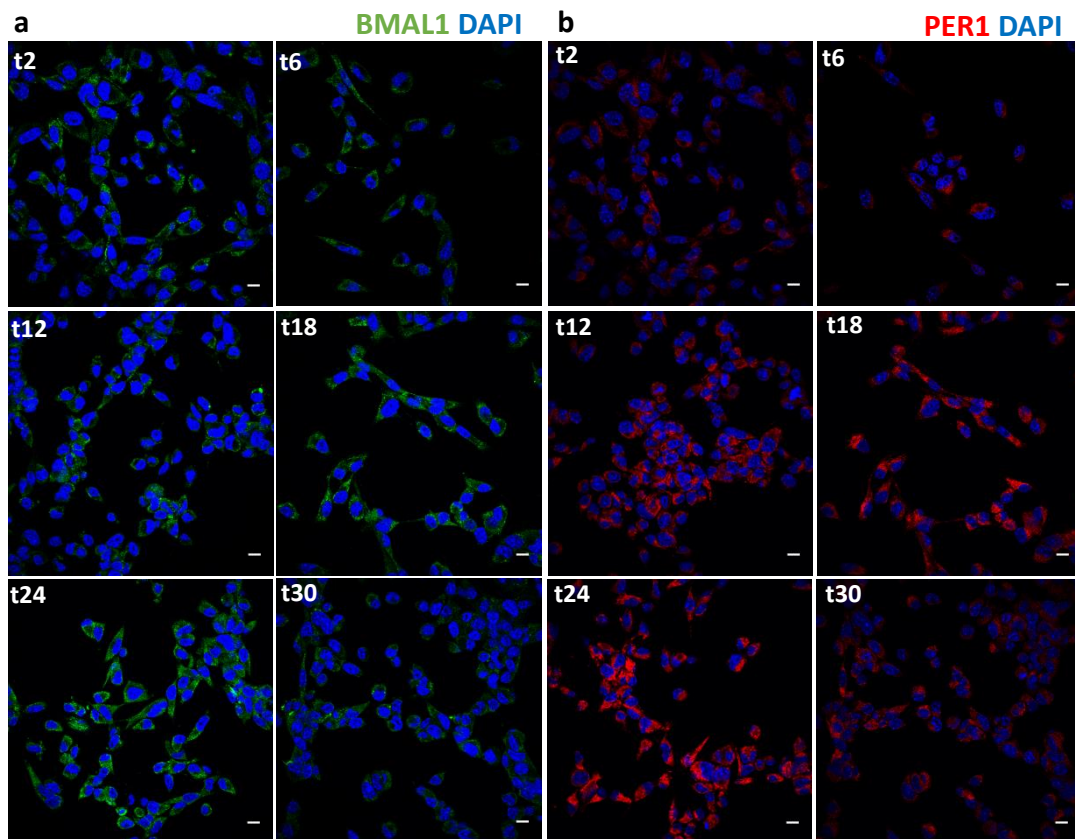


Figura 24: Variación temporal de proteínas reloj en células A530. Imágenes representativas de los niveles de las proteínas reloj BMAL1 (a) y PER1 (b) analizados mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal en células A530 sincronizadas por cambio de medio de cultivo y fijadas a distintos horarios a lo largo de 30 h. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. La cuantificación y el análisis estadístico se muestra en la Figura 25.

A partir de las imágenes de microscopía confocal, se cuantificó la intensidad de fluorescencia de cada anticuerpo para cada uno de los tiempos post-sincronización. Los resultados evidenciaron una variación temporal significativa en los niveles de PER1 con mayores niveles de expresión a los tiempos 12, 18 y 24 post-sincronización (*Fig. 25b*), mientras que no se observaron variaciones temporales en la expresión de BMAL1 (*Fig. 25a*).

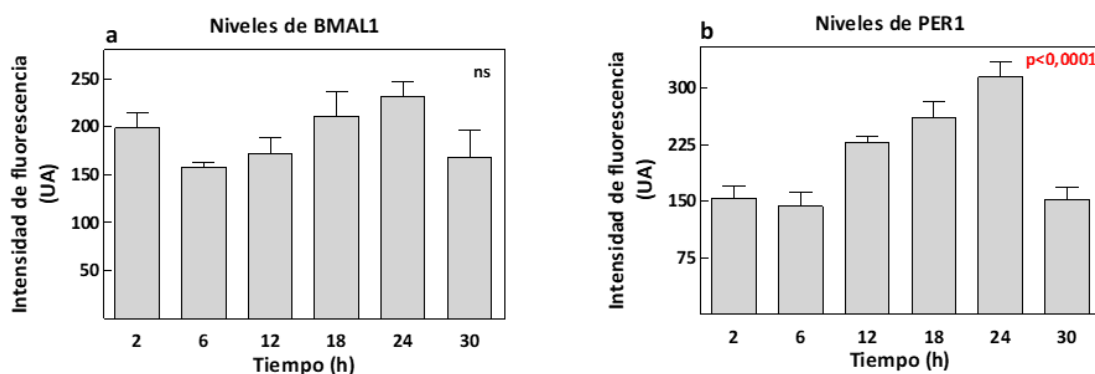


Figura 25: Cuantificación de los niveles de expresión de las proteínas reloj en células A530. Los niveles de expresión de las proteínas reloj revelan una variación temporal significativa para el caso de PER1 (b; ANOVA $p < 0.0001$) mientras que los niveles de BMAL1 no varían significativamente en el tiempo, si bien hay tendencia de mayores niveles a t_2 , t_{18} y t_{24} . Los niveles de proteínas fueron expresados como intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias, UA).

4.2.1.2 Determinación de los niveles de especies reactivas de oxígeno

El estado redox de las células A530 sincronizadas por cambio de medio de cultivo fue analizado por citometría de flujo. Para ello, las células fueron recolectadas cada 6 h durante 36 h e incubadas con la sonda 2'-7'-Diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína ($2 \mu\text{M}$) como fue detallado en Materiales y Métodos. Luego de analizar la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo, los resultados arrojaron una variación temporal significativa en el estado redox de las células (K-W, $p < 0.04$) evidenciando mayores niveles de ROS a los tiempos 0-6 h, una disminución a las 12 h y luego una oscilación amortiguada (Fig.26). Estas oscilaciones son típicas de un oscilador débil o resultado de una sincronización poco efectiva.

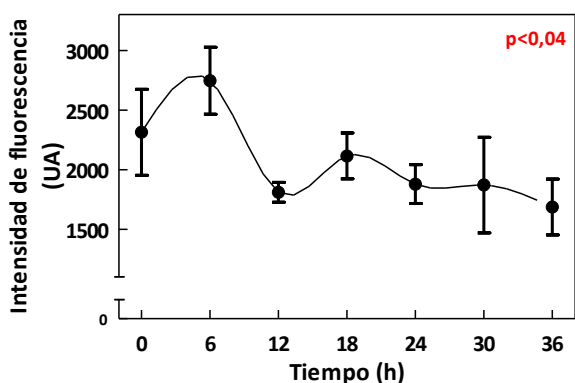


Figura 26: Variación temporal del estado redox en células A530. Luego de la sincronización, las células fueron cosechadas cada 6 h durante 36 h, y su estado redox se analizó utilizando la sonda DCFH-DA mediante citometría de flujo. El análisis estadístico reveló mayores niveles de ROS luego de 6 h de la sincronización (K-W $p < 0.04$; $n = 3$ experimentos). Los niveles de ROS fueron expresados como intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias, UA).

4.2.1.3 Respuesta diferencial al tratamiento con Bortezomib

Una vez evidenciada las diferencias temporales en la susceptibilidad al tratamiento quimioterapéutico con Bortezomib (BOR) en células T98G sincronizadas, nos propusimos investigar si estas observaciones también se reproducían en las células A530. Para ello, se adicionó BOR a las células A530 en cada uno de los tiempos post-sincronización como fue descrito en Materiales y Métodos. Luego de 24 h, se evaluó la viabilidad celular tomando como 100% de viabilidad aquellas células incubadas con DMSO (vehículo de la droga). Los resultados arrojaron un efecto temporal del tratamiento con la droga (K-W, $p < 0.006$) con los menores niveles de viabilidad en células sin sincronizar (t_0) y 36 h post-sincronización (Fig. 27).

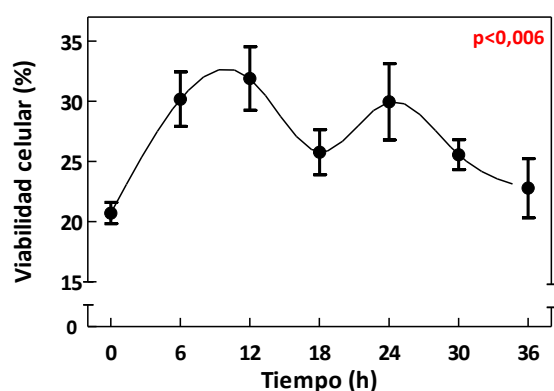


Figura 27: Susceptibilidad de células A530 al tratamiento con Bortezomib. Las células A530 fueron sincronizadas y tratadas con BOR (500 nM 24 h) a los distintos tiempos post-sincronización. La viabilidad celular se analizó mediante MTT evidenciando menores niveles de viabilidad a los tiempos 0 y 36 (K-W, $p < 0.006$; $n = 3$ experimentos). La viabilidad celular se expresó como porcentaje considerando el 100% de viabilidad aquellas células incubadas con el vehículo de la droga (DMSO).

Los resultados obtenidos tanto para el estado redox como la susceptibilidad al BOR en las células A530 presentan fluctuaciones que podrían reflejar un periodo corto de 12-18 h durante la primera oscilación que luego se ve amortiguada en tiempos más largos. Por tales observaciones, sugerimos que las células A530 presentan un oscilador débil en cultivo, evidenciando que quizás estas células requieran un agente sincronizante más fuerte que un cambio de medio de cultivo.

4.2.1.4 Caracterización de las células A530 A5

Con el objetivo de evaluar si existe algún vínculo entre el reloj molecular y la velocidad de crecimiento de los tumores provenientes de las células A530, se planteó alterar la expresión del gen reloj *Bmal1* en tales células. Para ello, se utilizó la tecnología de edición CRISPR/Cas9 y posterior selección de las células transfectadas con antibiótico. Posteriormente, se evaluaron distintos parámetros evidenciando una alteración en la expresión de *Bmal1* en el pool de células transfectadas denominado **A530 A5**.

En primer lugar, se evaluó la expresión del gen *Bmal1* y su target *Per1* mediante RT-PCR. Como se puede observar en la Figura 28 a-b, el pool de células A530 A5 evidenció una disminución en la

expresión del ARNm de ambos genes. Además, se evaluó la expresión del ARNm del gen *Bcl-2* el cual codifica para una proteína anti apoptótica, evidenciando un aumento en la expresión de su ARNm.

Posteriormente, se analizó la distribución del ciclo celular en células A530 y A530 A5 fijadas y teñidas con ioduro de propidio (Fig. 28 c). Los resultados evidenciaron un aumento en el porcentaje de células A530 A5 en las fases S+G₂-M respecto a las células A530. Estos resultados, en conjunto con un aumento en la expresión del ARNm del gen *Bcl-2*, sugieren que el pool de células A530 A5 presentan un mayor estado proliferativo que las células A530.

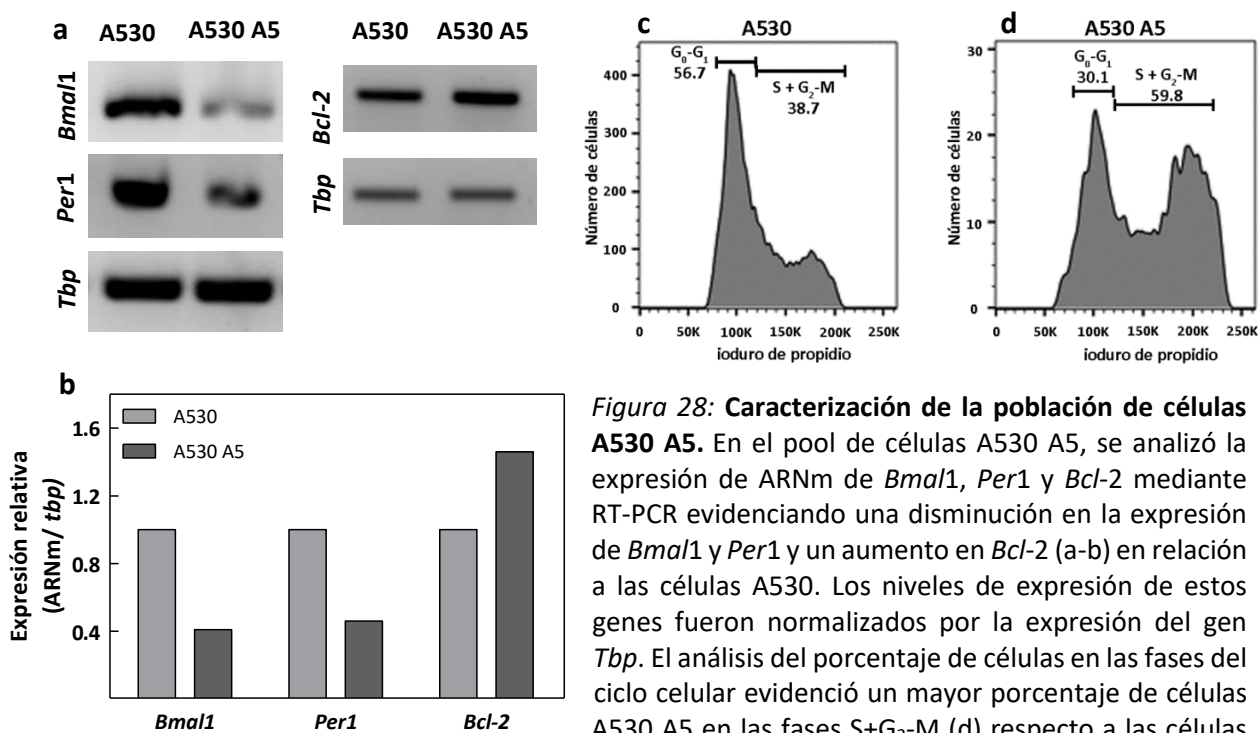


Figura 28: Caracterización de la población de células A530 A5. En el pool de células A530 A5, se analizó la expresión de ARNm de *Bmal1*, *Per1* y *Bcl-2* mediante RT-PCR evidenciando una disminución en la expresión de *Bmal1* y *Per1* y un aumento en *Bcl-2* (a-b) en relación a las células A530. Los niveles de expresión de estos genes fueron normalizados por la expresión del gen *Tbp*. El análisis del porcentaje de células en las fases del ciclo celular evidenció un mayor porcentaje de células A530 A5 en las fases S+G₂-M (d) respecto a las células A530 (c).

4.2.2 Determinación de la velocidad de crecimiento de células A530 inyectadas en ratones C57BL/6 mantenidos en ciclos regulares de Luz: Oscuridad (LO)

Los resultados presentados a continuación forman parte de antecedentes sobre los cuales se planteó la presente tesis y se realizaron en el laboratorio del Dr. Mario Guido en colaboración con los Dres. Fabiola Velázquez, César Prucca y Beatriz Caputto. Con el objetivo de estudiar el rol del sistema circadiano en el crecimiento tumoral, se planteó inyectar células A530 previamente sincronizadas por cambio de medio de cultivo a distintos horarios (ZT3, 3 h luego de prenderse la luz del bioterio y ZT15, 3 h luego de apagarse la luz del bioterio) en la zona del nervio ciático de ratones C57BL/6 mantenidos bajo ciclos regulares de LO. El seguimiento del crecimiento tumoral se realizó mediante mediciones periódicas, y posteriormente, se calculó la velocidad de crecimiento tumoral para cada uno de los

animales. A continuación (Fig. 29), se muestran los resultados obtenidos para cada grupo experimental.

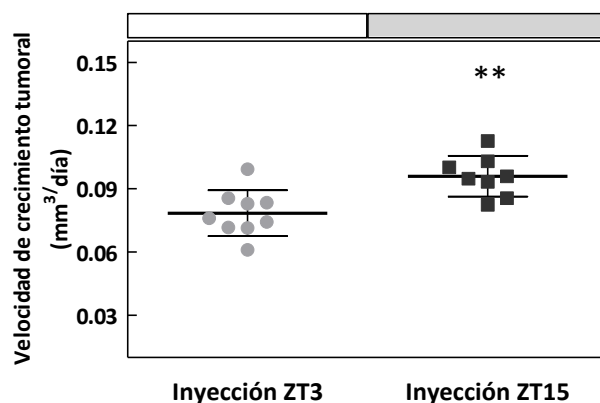


Figura 29: Crecimiento tumoral en ratones inyectados con células A530. La velocidad de crecimiento se calculó como la pendiente de la regresión lineal de la transformada logarítmica del volumen tumoral. Los resultados evidenciaron mayores tasas de crecimiento tumoral para el grupo de ratones inyectados en ZT15 respecto al grupo ZT3 ($p < 0.0017$, t-test; $n = 2$ experimentos). La barra en la parte superior representa el momento de inyección de células tumorales durante el día (blanco) y la noche (gris) en ratones mantenidos bajo un ciclo regular de LO.

El análisis estadístico reveló una diferencia significativa entre los grupos experimentales, evidenciando una mayor tasa de crecimiento de tumores provenientes de ratones inyectados al comienzo de la fase activa (ZT15) respecto a aquellos animales inyectados al comienzo de la fase de descanso (ZT3) (t-test, $p < 0.0017$).

En una segunda instancia, las células A530 fueron sincronizadas mediante un cambio de medio de cultivo en distintos horarios (día vs noche subjetiva) e inyectadas en un único horario en ratones mantenidos bajo ciclos regulares de LO. El volumen tumoral y velocidad de crecimiento se calculó como fue descrito en Materiales y Métodos, y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 30.

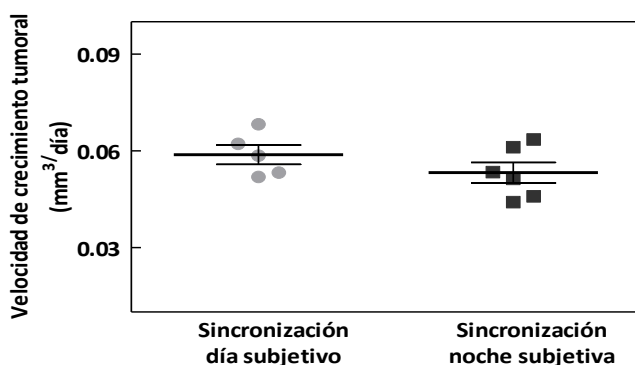


Figura 30: Crecimiento tumoral en ratones inyectados con células A530 sincronizadas en distintos horarios. La velocidad de crecimiento se calculó como la pendiente de la regresión lineal de la transformada logarítmica del volumen tumoral. Los resultados estadísticos no evidenciaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento tumoral entre los grupos experimentales ($p=0.12$, t-test; $n = 2$ experimentos).

Como se muestra en la Figura 30, no se observan diferencias significativas en el crecimiento tumoral cuando los animales fueron inyectados en un mismo horario con células sincronizadas a distintos horarios. Los resultados de ambos experimentos reflejan la importancia del estado de actividad y metabolismo del huésped.

A partir de estos resultados, se propuso estudiar en mayor profundidad la implicancia del sistema circadiano en la regulación del crecimiento tumoral. A continuación, se muestran los experimentos y resultados obtenidos en el transcurso de esta tesis.

4.2.3 Determinación de la velocidad de crecimiento de células A530 inyectadas en ratones C57BL/6 mantenidos en oscuridad constante

A fin de corroborar que las diferencias observadas en el crecimiento tumoral dependientes del horario de inyección de células tumorales A530 sea debido a una regulación circadiana endógena genuina, se propuso realizar el experimento en condiciones constantes de iluminación (*corrida libre*), sin recibir ninguna señal del medio externo.

Para ello, los animales previamente sincronizados a ciclos regulares de LO fueron trasladados a oscuridad constante (OO) durante 72 h previas al experimento. Como fue descrito en Materiales y Métodos, las células A530 fueron inyectadas al comienzo del día subjetivo (CT1-2) o al comienzo de la noche subjetiva (CT12-13), y los ratones se mantuvieron en OO hasta el día 15 post-inyección, momento en el cual los tumores comenzaron a ser palpables. Mediante mediciones periódicas del volumen tumoral, se calculó la velocidad de crecimiento de cada grupo experimental. En la Figura 31, se muestran los resultados obtenidos.

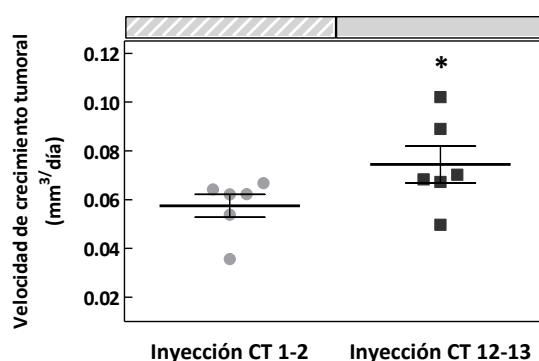
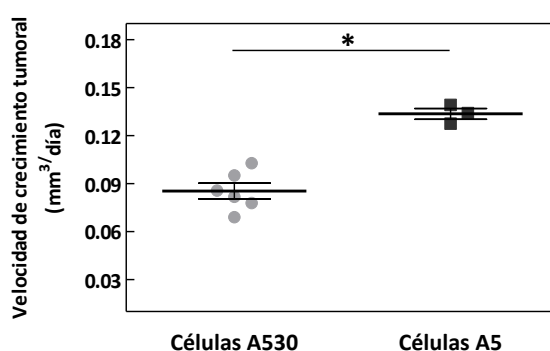


Figura 31: Crecimiento tumoral de células A530 inyectadas en ratones C57BL/6 mantenidos en OO. Los ratones mantenidos en OO fueron inyectados al comienzo del día (CT1-2) o noche subjetiva (CT12-13). La velocidad de crecimiento tumoral se calculó como la pendiente de la regresión lineal de la transformada logarítmica del volumen tumoral. El análisis estadístico reveló una mayor tasa de crecimiento tumoral en los ratones pertenecientes al grupo CT12-13 respecto al grupo CT1-2 ($p < 0.021$, M-W; $n = 3$ experimentos). La barra gris en la parte superior representa el momento de inyección de células tumorales durante el día subjetivo (tramado) y la noche subjetiva (relleno) en ratones mantenidos en OO.

El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los grupos experimentales evidenciando una mayor tasa de crecimiento tumoral para el grupo de ratones inyectados al comienzo de la noche subjetiva (CT12-13) respecto a los animales inyectados al comienzo del día subjetivo (CT1-2) (M-W, $p < 0.021$). Estos resultados indican fuertemente el funcionamiento y participación del reloj biológico endógeno en el crecimiento tumoral.

4.2.4 Determinación de la velocidad de crecimiento de células A530 y A530 A5 inyectadas en ratones C57BL/6

Considerando que los resultados anteriormente presentados sugieren una regulación temporal en el crecimiento del tumor, se propuso estudiar el rol del activador molecular *Bmal1* en la tasa de crecimiento tumoral. Para ello, ratones C57BL/6 fueron inyectados en un único horario con células A530 A5 que presentan una disminución en la expresión de *Bmal1* y células A530. Una vez inyectados ambos grupos de células, se realizó el seguimiento del tumor mediante mediciones periódicas con calibre y posteriormente, se calculó la velocidad de crecimiento de ambos grupos experimentales, lo cual puede observarse en la Figura 32.



B16 de melanoma murino. Estas células fueron inyectadas en ratones C57BL/6 mantenidos en ciclos regulares de LO de manera subcutánea al comienzo de la fase de descanso (ZT1-2) o al comienzo de la fase activa (ZT12-13). Luego de 7-10 días post-inyección, los tumores fueron palpables y mediante mediciones periódicas con calibre se realizó el seguimiento del tumor. A continuación (Fig. 33), se muestra el volumen tumoral y el cálculo de velocidad de crecimiento para un ratón representativo de cada grupo experimental.

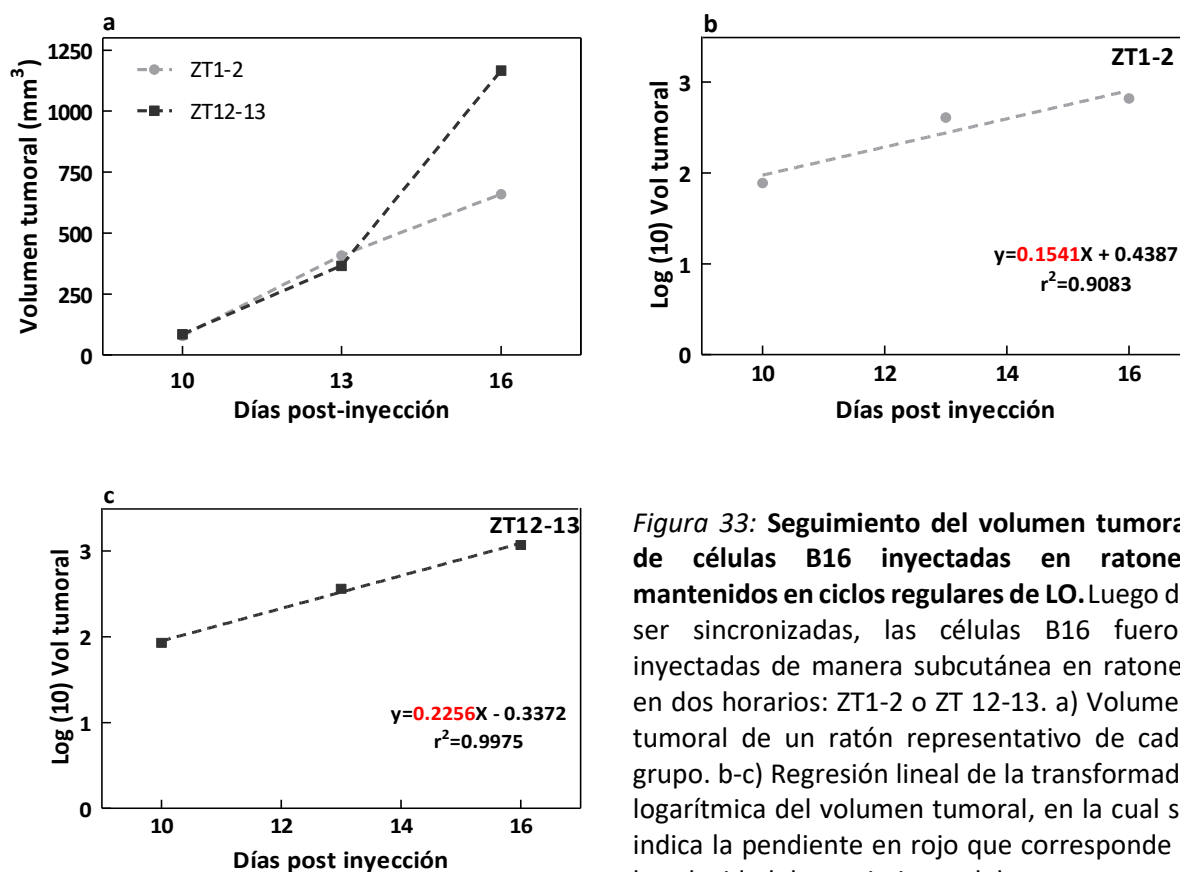


Figura 33: Seguimiento del volumen tumoral de células B16 inyectadas en ratones mantenidos en ciclos regulares de LO. Luego de ser sincronizadas, las células B16 fueron inyectadas de manera subcutánea en ratones en dos horarios: ZT1-2 o ZT 12-13. a) Volumen tumoral de un ratón representativo de cada grupo. b-c) Regresión lineal de la transformada logarítmica del volumen tumoral, en la cual se indica la pendiente en rojo que corresponde a la velocidad de crecimiento del tumor.

Luego de calcular la velocidad de crecimiento tumoral para cada uno de los animales en estudio, los resultados revelaron diferencias significativas evidenciando mayores tasas de crecimiento tumoral en el grupo de ratones inyectados al comienzo de la fase activa (ZT12-13) en relación con los que fueron inyectados al comienzo de la fase de descanso (ZT1-2) (M-W, $p < 0.01$) (Fig. 34).

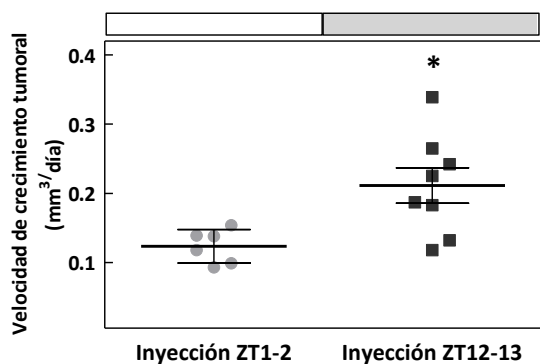


Figura 34: Crecimiento tumoral en ratones inyectados con células B16. Las velocidades de crecimiento se calcularon como la pendiente de la regresión lineal de la transformada logarítmica del volumen tumoral. Los resultados evidenciaron mayores tasas de crecimiento tumoral para el grupo de ratones inyectados en ZT12-13 respecto al grupo ZT1-2 ($p < 0.01$, M-W; $n = 2$ experimentos). La barra en la parte superior representa el momento de inyección de células tumorales durante el día (blanco) y la noche (gris) en ratones mantenidos bajo un ciclo regular de LO.

4.2.4 Tratamiento quimioterapéutico de tumores provenientes de células A530

Considerando que los resultados obtenidos sugieren un control temporal en el crecimiento del tumor, se planteó estudiar si esta regulación también está implicada en la respuesta a tratamientos quimioterapéuticos. Para ello, los tumores provenientes de células A530 fueron tratados con el inhibidor de proteosoma Bortezomib (BOR) en dos horarios (día vs noche) y se calculó la velocidad de crecimiento tumoral. En la Figura 35, se muestran los resultados obtenidos.

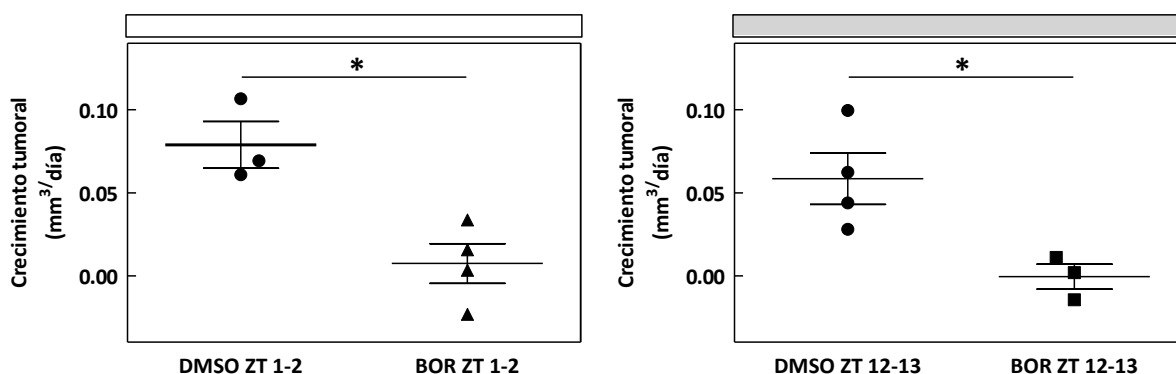


Figura 35: Crecimiento de tumores provenientes de células A530 tratados con BOR. Alrededor del día 15 post-inyección, los tumores fueron tratados con 4 administraciones intraperitoneales del vehículo de la droga (DMSO) o BOR durante una semana. En paralelo, se realizó el seguimiento tumoral y peso de los animales. A partir de mediciones periódicas del volumen tumoral, se calculó la velocidad de crecimiento para cada grupo experimental. Los tumores tratados con BOR presentaron velocidades significativamente menores en relación a su respectivo grupo control ($p < 0.03$, M-W; $n = 2$ experimentos). La barra en la parte superior representa el momento de inyección del vehículo (DMSO) o BOR durante el día (blanco) y la noche (gris) en ratones mantenidos bajo un ciclo regular de LO.

Como puede observarse en la Figura 35, las velocidades de crecimiento de los animales tratados con BOR difieren significativamente de sus respectivos controles inyectados con el vehículo de la droga (M-W, $p < 0.03$). No obstante, no se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento tumoral entre los ratones tratados con BOR al comienzo del día o al comienzo de la noche.

En segundo lugar, se calculó el índice TGI el cual compara los volúmenes iniciales y finales de cada grupo tratado respecto a su grupo control. Para los animales tratados con BOR al comienzo del día obtuvimos un 98% de inhibición tumoral, mientras que los animales tratados al comienzo de la noche arrojaron un valor de 102% de inhibición, lo cual estaría reflejando una regresión sumamente potente del volumen tumoral en ambos horarios.

4.3 DISCUSIÓN

Como segunda instancia de esta tesis, nos planteamos estudiar si existe una regulación temporal del crecimiento tumoral en un modelo *in vivo*, utilizando células tumorales A530 derivadas del sistema nervioso periférico y células B16 de melanoma capaces de formar tumores una vez inyectadas en ratones C57BL/6. En primer lugar, los estudios en cultivo evidenciaron una variación temporal en la expresión de la proteína reloj PER1 y en el estado redox de células A530 sincronizadas, como así también menores niveles de viabilidad al tiempo 36 h post-sincronización luego del tratamiento con el quimioterapéutico BOR. Al comparar estos resultados con los obtenidos para la línea celular T98G, podemos sugerir que las células A530 en cultivo presentan un oscilador débil con una oscilación marcada de 12-18 h y luego la periodicidad se amortigua. Podríamos considerar que estas células requieren un agente sincronizante más fuerte que un cambio de medio de cultivo, por ejemplo, un *shock* de DEX o de suero al 20% durante 2 h que permita fortalecer la función del reloj circadiano. Cabe destacar que las células T98G no son capaces de generar tumores en ratones C57BL/6 por lo que los experimentos *in vivo* se realizaron con las células tumorales A530 y B16.

Regulación del sistema circadiano en el crecimiento tumoral

El equilibrio entre el organismo y los ciclos de LO del ambiente mantienen la homeostasis del organismo. Estudios en modelos animales muestran que una disrupción por cambios en los ciclos de LO o alimentación/ayuno, o mutaciones genéticas de los genes circadianos, inducen cambios patológicos que afectan notablemente la salud humana y animal [315]. Si bien las respuestas diurnas del huésped a infecciones letales y endotoxinas se demostraron por primera vez hace casi 60 años [316], estudios recientes esclarecen los múltiples aspectos de las funciones inmunes que se encuentran bajo el control del reloj circadiano. Estos incluyen el tráfico de células inmunes, interacciones huésped-patógeno y activación de la inmunidad innata y adaptativa [304, 317–319]. De este modo, se sugiere que señales circadianas están involucradas en el control de la magnitud de la respuesta inmune de manera tiempo-dependiente. En este contexto, nuestros hallazgos resultan novedosos y fortalecen el vínculo entre el momento del desafío y la respuesta desencadenada. Durante el transcurso de esta tesis, hemos evidenciado que la inyección de células tumorales con la

consecuente formación de tumores está sujeta a un preciso control temporal. Es así, que tumores provenientes de animales inyectados al comienzo de la noche presentan una mayor velocidad de crecimiento que aquellos inyectados al comienzo del día. Estos resultados fueron observados con dos modelos celulares, células tumorales A530 del sistema nervioso periférico y células B16 de melanoma, sugiriendo que podría ser un fenómeno universal en la formación y desarrollo de tumores. Más aún, los experimentos realizados en oscuridad constante nos permiten inferir sobre la existencia de un verdadero ritmo endógeno sobre la regulación del crecimiento tumoral, dado que las diferencias día/noche observadas previamente también se encontraron entre el día y la noche subjetiva, en ausencia de señales lumínicas. Nuestros resultados sugieren una regulación temporal principalmente por parte del huésped, ya que no se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento tumoral cuando las células A530 fueron sincronizadas a distintos horarios e inyectadas a un mismo horario en los ratones.

A fin de explicar las diferencias día/noche observadas en el crecimiento tumoral, planteamos evaluar las distintas poblaciones de células inmunes en los horarios de inyección de células tumorales. Estudios preliminares realizados en colaboración con las Dras. Mariana Maccioni y Silvia Correa (CIBICI – CONICET) evidencian un mayor porcentaje de células inmunes NK y NKT en ganglio inguinal de ratones extraído al comienzo del día en relación a muestras del órgano extraídas al comienzo de la noche. Considerando que la población de células NK constituyen elementos claves en la inmunidad innata y su función citolítica es la primera línea de defensa contra células tumorales [320, 321], podríamos especular que al comienzo de la noche, el huésped se encuentra más desprotegido a nivel inmunológico en relación a su estado al comienzo del día, lo cual podría explicar en parte las mayores tasas de crecimiento tumoral registradas cuando los animales son inyectados durante la noche.

En este sentido, diversos estudios sugieren que las horas iniciales en la generación de la respuesta adaptativa y el número de células presentes en nódulos linfáticos podrían ser críticas en la regulación de la respuesta desencadenada (Moon et al., 2007). Por ejemplo, Matveeva y colaboradores demostraron que ratones inmunizados durante la fase de luz (ZT8, 8 h luego de prenderse la luz) mostraron una progresión de la enfermedad EAE (encefalomielitis experimental autoinmune) dramáticamente acelerada dos semanas después, con puntuaciones clínicas más altas en comparación con los animales inmunizados en la noche tardía (ZT20, 8 h luego de apagarse la luz). Los ratones inmunizados a ZT8 presentaron elevadas cantidades de ARNm de IL-2 y mayor número de CD4⁺ productoras de IL-17 en nódulos linfáticos, subtipos críticos en la inducción de EAE. Luego de dos días de la inducción de EAE, se detectó un incremento tanto de células CD4⁺ y CD8⁺ *naïve* y activadas en nódulo linfático drenante de animales inmunizados a ZT8, mientras que en animales a ZT20 el número de células T se mantuvo relativamente bajo [322]. En otra serie de experimentos se ha

evidenciado que la susceptibilidad al *shock* endotóxico inducido por lipopolisacárido en ratones es dependiente del tiempo de administración en un ciclo regular de LO y vinculado a patrones dependientes del tiempo en la secreción de citoquinas [323]. Una administración letal de lipopolisacárido reduce la sobrevida cuando se administra durante la noche respecto a los animales desafiados a la mañana [324]. Estos resultados en combinación con nuestros hallazgos fortalecen la importancia del estado del huésped y el momento del desafío en relación a la respuesta desencadenada.

Por otro lado, algunos estudios indican que los genes reloj podrían actuar como supresores tumorales [300] mientras que otros hallazgos sugieren una relación más compleja entre los ritmos circadianos y cáncer [325]. Por ejemplo, Puram y colaboradores reportaron que una disrupción del circuito circadiano altera el crecimiento de células de leucemia murina *in vivo* y en líneas celulares humanas en cultivo, induciendo diferenciación mieloide que reduce la expresión del marcador de superficie c-kit, típico marcador de células madres de leucemia [326]. También evidencian que CLOCK y BMAL1 regulan la proliferación celular y progresión del ciclo celular en células de leucemia mieloide aguda, consistente con fenotipos reportados en otros modelos [63, 288, 327].

Por el contrario, Jiang y su grupo de investigación han propuesto a BMAL1 como posible anti-oncogen en cáncer de páncreas regulando positivamente a la vía p53 de supresión tumoral, lo que inhibe la formación e invasión del cáncer de páncreas [302]. En carcinoma escamoso de células de la lengua se evidenció que la expresión ectópica de BMAL1 inhibe la proliferación celular, migración e invasión *in vitro*, y el crecimiento tumoral en modelos de ratones. A su vez, células que sobre expresan BMAL1 mostraron un incremento relativo en la apoptosis luego de la exposición a paclitaxel y mayor susceptibilidad a la droga en modelos *in vivo* [328]. Nuestros resultados podrían sumar evidencias a estos últimos dado que observamos una mayor velocidad de crecimiento en los tumores inyectados con células A530 A5 que expresaban menores niveles de *Bmal1* teniendo deteriorado el reloj molecular. A su vez, las células A530 A5 en cultivo presentaron un mayor estado proliferativo evidenciado por una mayor proporción de células en la fase S-G₂/M del ciclo celular. Considerando el rol clave que juega BMAL1 en la transducción de señales intracelulares y regulación de diferentes procesos celulares, como la progresión del ciclo celular, metabolismo de lípidos y glucosa, reacciones redox y respuesta a estrés [67, 157, 329], podríamos sugerir que una disminución en la expresión de BMAL1 favorece el crecimiento tumoral.

En relación al tratamiento quimioterapéutico con BOR, no se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de los ratones tratados al comienzo del día o de la noche. No obstante, los índices TGI fueron cercanos al 100% para ambos grupos, por lo que podríamos especular que la dosis utilizada fue muy elevada, sumamente efectiva y tóxica para los animales. Esto

también se vio reflejado en la disminución del peso de los animales (información no mostrada) y en los valores de velocidades de crecimiento cercanos a 0. Por estos resultados, proponemos en experimentos futuros administrar aproximadamente un 30% de la dosis reportada a fin de evaluar la capacidad del reloj circadiano de modular la respuesta al tratamiento.

RESUMEN GRAFICO
REGULACIÓN TEMPORAL DEL CRECIMIENTO TUMORAL

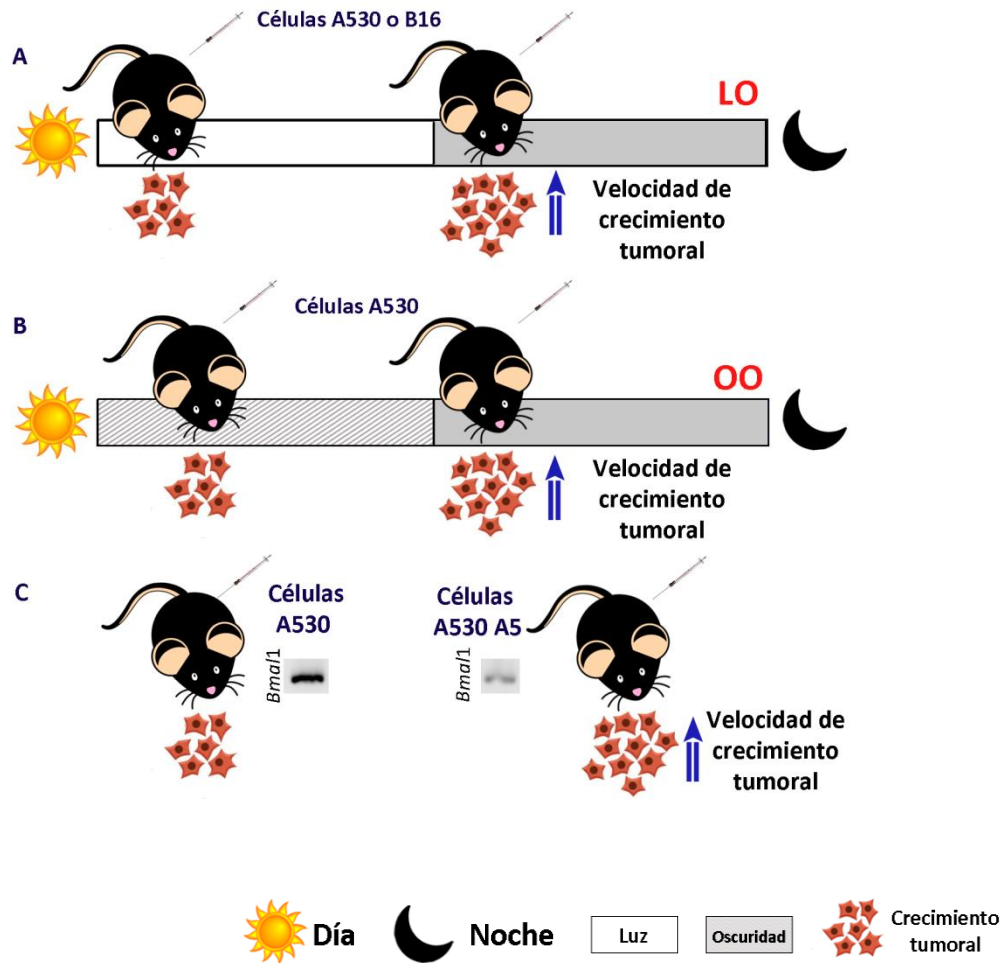
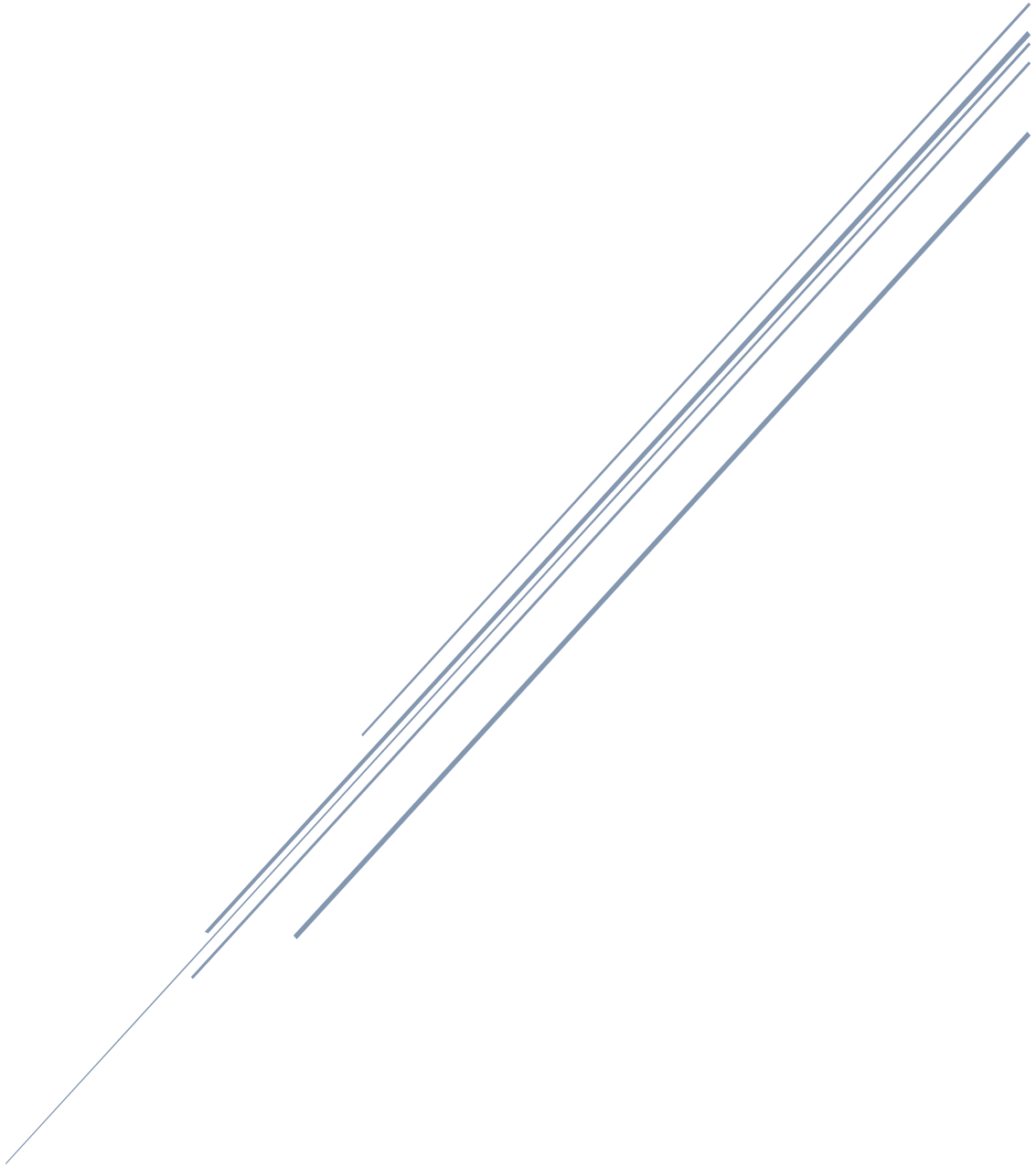


Figura 36: Esquema representativo de los resultados obtenidos en relación a la regulación del crecimiento tumoral por el reloj circadiano. Los ratones mantenidos en ciclos regulares de Luz: Oscuridad (LO) e inyectados con células tumorales (A530 y B16) al comienzo la fase activa (oscuridad) evidenciaron mayores tasas de crecimiento tumoral en relación a los animales inyectados al comienzo de la fase de descanso (luz) (A). Resultados similares fueron observados en condiciones de corrida libre, en ausencia de señales externas (oscuridad constante, OO), sugiriendo un verdadero ritmo endógeno en el crecimiento tumoral (B). A su vez, se evidenciaron mayores tasas de crecimiento tumoral en aquellos ratones inyectados con células A530 A5 (menor expresión de *Bmal1*) respecto a las células A530, fortaleciendo aún más el vínculo entre el reloj molecular y el crecimiento tumoral (C).

CAPITULO V

Conclusiones generales



CAPÍTULO V: CONCLUSIONES GENERALES

Los hallazgos pioneros obtenidos en el transcurso de esta tesis sugieren la presencia de un oscilador metabólico/redox funcional en células T98G provenientes de glioblastoma humano, evidenciado por oscilaciones en el contenido endógeno de lípidos, actividad de la enzima PAP involucrada en la síntesis *de novo* de GFLs como así también en el estado redox celular. A su vez, estas células exhibieron una respuesta temporal significativa en la susceptibilidad al tratamiento con el quimioterapéutico BOR, con menores niveles de viabilidad celular en una ventana de tiempo de 12 a 24 h, lo cual se correlacionó con altos niveles de ROS en estos tiempos post-sincronización. Más aún, las células previamente tratadas con BOR evidenciaron mayores niveles de ROS en relación a las células control, fortaleciendo el vínculo entre el estado redox de las células al momento de administrar el quimioterapéutico y la susceptibilidad a la droga. En conclusión, estos resultados plantean un oscilador metabólico/redox funcional en células tumorales T98G en cultivo y su vínculo con la maquinaria transcripcional circadiana, dado que el período de 12 h en los niveles de ROS se extendió a 18 h cuando se alteró la expresión del activador molecular *Bmal1*, como así también se alteró la susceptibilidad al tratamiento con BOR.

Por otro lado, la modulación farmacológica a través de agonistas sintéticos de los componentes REV-ERBs evidenció efectos citotóxicos en las células T98G alterando vías metabólicas como, por ejemplo, la acumulación de lípidos en gotas lipídicas. Considerando la importancia del metabolismo en el crecimiento tumoral y que las proteínas reloj REV-ERBs actúan como represores del metabolismo lipídico, planteamos estudiar en experimentos futuros cómo estos agonistas alteran otras vías metabólicas, por ejemplo, a nivel de síntesis *de novo* de lípidos, desencadenando efectos adversos en la supervivencia de células tumorales. Estudios con mayor profundidad son necesarios para determinar cómo se desregula el metabolismo en un contexto tumoral desde un punto de vista cronobiológico, y cómo esta información pueda ser de utilidad para el diseño de terapias efectivas.

Por último, los resultados de los experimentos realizados con un modelo *in vivo*, proponen un estrecho vínculo entre el reloj circadiano y el crecimiento de tumores generados a partir de la inyección de células tumorales A530 y B16. Este control temporal evidenció mayores tasas de crecimiento tumoral en ratones mantenidos bajo ciclos regulares de LO e inyectados durante la noche respecto al grupo de inyección durante el día con ambos modelos tumorales. Más aún, estas diferencias también fueron observadas cuando los animales se mantuvieron en oscuridad constante, es decir, en ausencia de señales lumínicas, indicando un verdadero ritmo endógeno en el crecimiento tumoral. Luego de alterar la expresión de *Bmal1* en células A530, se observaron mayores velocidades de crecimiento respecto a los tumores provenientes de células A530 control, fortaleciendo la relación

entre la maquinaria transcripcional del reloj circadiano y el desarrollo del tumor. Comprender y ahondar en la regulación tumoral desde un punto de vista cronobiológico ayudará a diseñar nuevos tratamientos que permitan maximizar los beneficios terapéuticos en momentos determinados del día minimizando a su vez los efectos adversos de la terapia.

Los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis forman parte de las siguientes publicaciones y han sido presentados en los congresos nombrados a continuación:

Publicaciones:

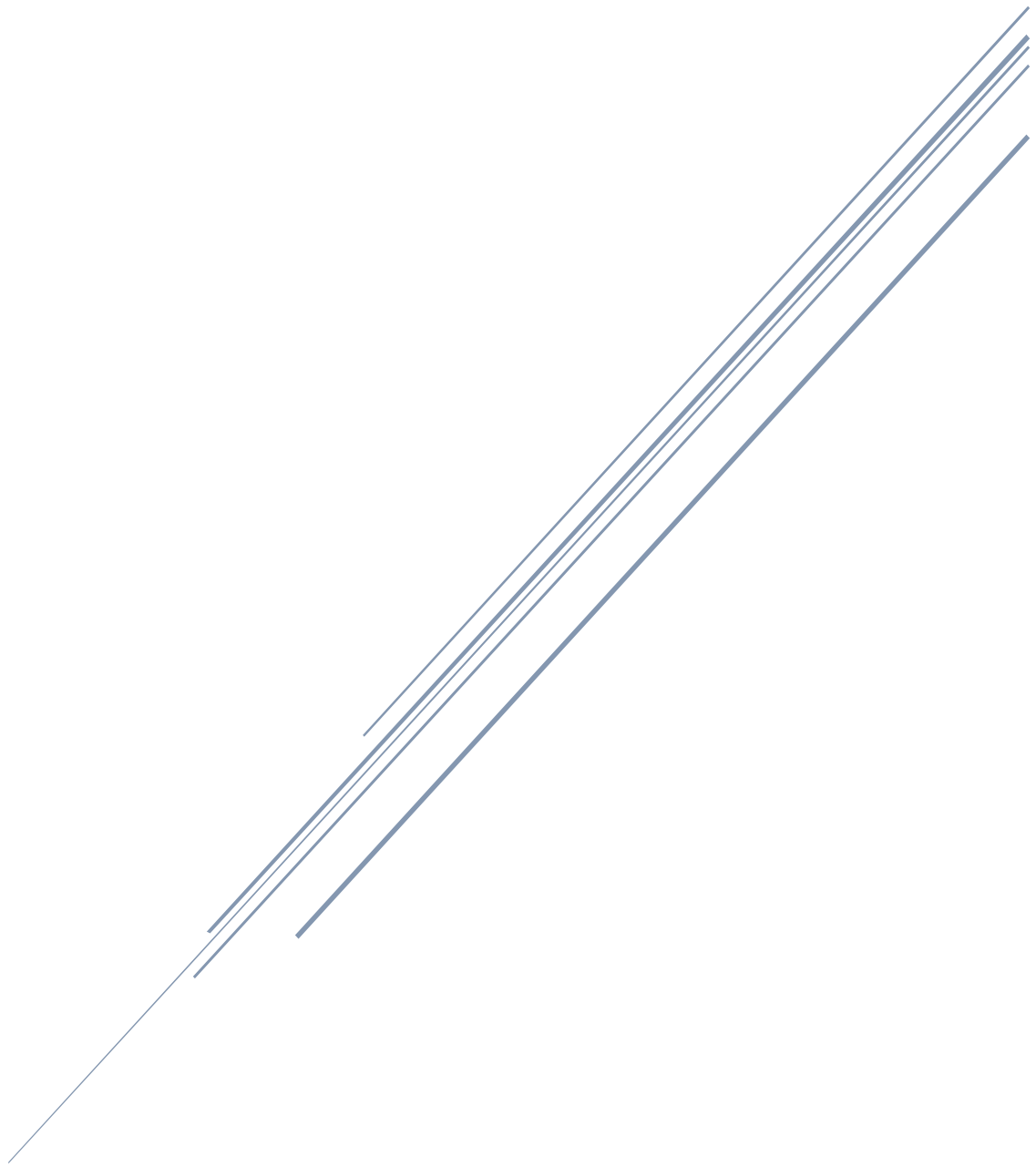
- Wagner PM, Sosa Alderete LG, Gorné LD, et al (2018). Proliferative Glioblastoma Cancer Cells Exhibit Persisting Temporal Control of Metabolism and Display Differential Temporal Drug Susceptibility in Chemotherapy. Mol Neurobiol. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1152-3>.
- Wagner PM, Monjes NM, Guido ME (2019). The chemotherapeutic effect of SR9009, a REV-ERB agonist, on the human glioblastoma T98G cells. ASN Neuro.
- Wagner PM, Prucca CG, Velázquez F, et al. Temporal control of tumor growth in nocturnal mammals: impact of the circadian system. En preparación.

Presentaciones en congresos:

- “Temporal control of tumor formation and growth in nocturnal mammals: impact of the circadian system”. PM Wagner, C G Prucca, F Velázquez, L Sosa-Alderete, B Caputto, M E Guido. XV Latin American Symposium on Chronobiology. 7-11 de Octubre, 2019 - Uruguay. Poster.
- “Temporal control of metabolism in proliferative glioblastoma cancer cells with differential time-regulated chemotherapy susceptibility”. Mario E. Guido, Paula M. Wagner, Lucas G. Sosa Alderete. Neuroscience 2018. 3-7 de Noviembre, 2018 – San Diego. Poster.
- “Temporal control of tumor formation and growth in nocturnal mammals: impact of the circadian system”. PM Wagner, C G Prucca, F Velázquez, L Sosa-Alderete, B Caputto, M E Guido. Congreso Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. 24-26 de Octubre, 2018-Córdoba. Poster.
- “Circadian control of lipid and redox metabolisms in proliferative glioblastoma cancer cells”. PM Wagner, L Sosa-Alderete, L Gorné, M Guido. Reunión Conjunto de Sociedades de Biociencias. 13-17 de Noviembre, 2017- Buenos Aires. Mini oral.
- “A metabolic circadian clock controls rhythms in immortalized human glioblastoma T98G cells”. PM Wagner, L Sosa-Alderete, L Gorné, V Gaveglio, G Salvador, S Pasquare, ME Guido. LII Reunión Anual de la Sociedad Argentina. Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular. 7-10 de noviembre, 2016. Córdoba. Comunicación oral.
- “T98G Glioblastoma cells: a tumor model to investigate the circadian regulation of clock gene expression and phospholipid synthesis”. Lucas G. Sosa-Alderete, Paula M. Wagner, Lucas Gorné and Mario E. Guido. International Conference on the Bioscience of Lipids. 22-26 de septiembre, 2015 – Puerto Iguazú. Poster.

CAPITULO VI

Bibliografía



CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA

1. Dunlap JC (1999) Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell* 96:271–290. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80566-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80566-8)
2. Golden SS, Canales SR (2003) Cyanobacterial circadian clocks — timing is everything. *Nat Rev Microbiol* 1:191–199. <https://doi.org/10.1038/nrmicro774>
3. Pittendrigh CS, Miller HA (1993) TEMPORAL ORGANIZATION: Reflections of a Darwinian Clock-Watcher
4. Giebultowicz J (2004) Chronobiology: Biological Timekeeping. *Integr Comp Biol* 44:266–266. <https://doi.org/10.1093/icb/44.3.266>
5. Czeisler CA, Gooley JJ (2007) Sleep and Circadian Rhythms in Humans. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72:579–597. <https://doi.org/10.1101/sqb.2007.72.064>
6. Edmonds SC, Adler NT (1977) Food and light as entrainers of circadian running activity in the rat. *Physiol Behav* 18:915–919. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(77\)90201-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(77)90201-3)
7. Moore-Ede MC, Schmelzer WS, Kass DA, Herd JA (1976) Internal organization of the circadian timing system in multicellular animals. *Fed Proc* 35:2333–8
8. Palmer J (1976) *An Introduction to Biological Rhythms*. Elsevier Science
9. Aschoff J, Hoffmann K, Pohl H, Wever R Re-entrainment of circadian rhythms after phase-shifts of the Zeitgeber. *Chronobiologia* 2:23–78
10. Kavanau JL (1969) Influences of Light on Activity of Small Mammals. *Ecology* 50:548–557. <https://doi.org/10.2307/1936245>
11. Golombek DA, Rosenstein RE (2010) Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* 90:1063–102. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2009>
12. Guido ME, Garbarino-Pico E, Contin MA, et al (2010) Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: Novel players in the circadian system. *Prog Neurobiol* 92:484–504. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2010.08.005>
13. Guido ME, Carpentieri AR, Garbarino-Pico E (2002) Circadian Phototransduction and the Regulation of Biological Rhythms. *Neurochem Res* 27:1473–1489. <https://doi.org/10.1023/A:1021696321391>
14. Quintero JE, Kuhlman SJ, McMahan DG (2003) The biological clock nucleus: a multiphasic oscillator network regulated by light. *J Neurosci* 23:8070–6. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-22-08070.2003>
15. Gooley JJ, Lu J, Chou TC, et al (2001) Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci* 4:1165–1165. <https://doi.org/10.1038/nn768>
16. Dibner C, Schibler U, Albrecht U (2010) The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annu Rev Physiol* 72:517–549. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135821>
17. Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS (2012) Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci* 35:445–462. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153128>
18. Schibler U (2009) The 2008 Pittendrigh/Aschoff Lecture: Peripheral Phase Coordination in the Mammalian Circadian Timing System. *J Biol Rhythms* 24:3–15. <https://doi.org/10.1177/0748730408329383>
19. Brown SA, Zimbrunn G, Fleury-Olela F, et al (2002) Rhythms of Mammalian Body Temperature Can Sustain Peripheral Circadian Clocks. *Curr Biol* 12:1574–1583. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01145-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01145-4)
20. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93:929–37
21. Yoo S-H, Yamazaki S, Lowrey PL, et al (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5339. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308709101>
22. Gooley JJ, Chua EC-P (2014) Diurnal Regulation of Lipid Metabolism and Applications of

- Circadian Lipidomics. *J Genet Genomics* 41:231–250. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2014.04.001>
23. Silver R, Moore RY (1998) The Suprachiasmatic Nucleus and Circadian Function: an Interoduction. *Chronobiol Int* 15:vii–x. <https://doi.org/10.3109/07420529808998698>
 24. Moore RY, Speh JC, Patrick Card J (1995) The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 352:351–366. <https://doi.org/10.1002/cne.903520304>
 25. Cassone VM, Roberts MH, Moore RY (1988) Effects of melatonin on 2-deoxy-[1-14C]glucose uptake within rat suprachiasmatic nucleus. *Am J Physiol* 255:R332-7. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1988.255.2.R332>
 26. Earnest DJ, Sladek CD, Gash DM, Wiegand SJ (1989) Specificity of circadian function in transplants of the fetal suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 9:2671–7
 27. Gillette' MU, Reppert SM The Hypothalamic Suprachiasmatic Nuclei: Circadian Patterns of Vasopressin Secretion and Neuronal Activity In Vitro
 28. Green DJ, Gillette R (1982) Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res* 245:198–200. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90361-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90361-4)
 29. Newman GC, Hospod FE (1986) Rhythm of suprachiasmatic nucleus 2-deoxyglucose uptake in vitro. *Brain Res* 381:345–350. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90086-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90086-7)
 30. Drucker-Colín R, Aguilar-Roblero R, García-Hernández F, et al (1984) Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res* 311:353–7
 31. Hoyle NP, O'Neill JS (2015) Oxidation-reduction cycles of peroxiredoxin proteins and nontranscriptional aspects of timekeeping. *Biochemistry* 54:184–193. <https://doi.org/10.1021/bi5008386>
 32. Sawaki Y, Nihonmatsu I, Kawamura H (1984) Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions. *Neurosci Res* 1:67–72
 33. Silver R, LeSauter J, Tresco PA, Lehman MN (1996) A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 382:810–813. <https://doi.org/10.1038/382810a0>
 34. Herzog ED (2007) Neurons and networks in daily rhythms. *Nat Rev Neurosci* 8:790–802. <https://doi.org/10.1038/nrn2215>
 35. Foley LE, Gegear RJ, Reppert SM (2011) Human cryptochrome exhibits light-dependent magnetosensitivity. *Nat Commun* 2:356. <https://doi.org/10.1038/ncomms1364>
 36. Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, et al (2003) Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 302:1408–12. <https://doi.org/10.1126/science.1089287>
 37. Ko CH, Yamada YR, Welsh DK, et al (2010) Emergence of noise-induced oscillations in the central circadian pacemaker. *PLoS Biol* 8:e1000513. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000513>
 38. Liu C, Weaver DR, Strogatz SH, Reppert SM (1997) Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* 91:855–60. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80473-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80473-0)
 39. Guido ME, Pico EG, Caputto BL (2001) Circadian regulation of phospholipid metabolism in retinal photoreceptors and ganglion cells. *J Neurochem* 76:835–845. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00081.x>
 40. Garbarino-Pico E, Valdez DJ, Contín MA, et al (2005) Rhythms of glycerophospholipid synthesis in retinal inner nuclear layer cells. *Neurochem Int* 47:260–270. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2005.04.024>
 41. Nagoshi E, Saini C, Bauer C, et al (2004) Circadian Gene Expression in Individual Fibroblasts: Cell-Autonomous and Self-Sustained Oscillators Pass Time to Daughter Cells. *Cell* 119:693–705. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2004.11.015>
 42. Balsalobre A, Marcacci L, Schibler U (2000) Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr Biol* 10:1291–1294. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00758-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00758-2)
 43. Welsh DK, Yoo S-H, Liu AC, et al (2004) Bioluminescence Imaging of Individual Fibroblasts

- Reveals Persistent, Independently Phased Circadian Rhythms of Clock Gene Expression. *Curr Biol* 14:2289–2295. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.11.057>
44. MARQUEZ S, CRESPO P, CARLINI V, et al (2004) The metabolism of phospholipids oscillates rhythmically in cultures of fibroblasts and is regulated by the clock protein PERIOD 1. *FASEB J* 18:519–521. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0417fje>
 45. Yamazaki S, Numano R, Abe M, et al (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288:682–5. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.288.5466.682>
 46. Hardin PE, Hall JC, Rosbash M (1990) Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* 343:536–540. <https://doi.org/10.1038/343536a0>
 47. Aronson BD, Johnson KA, Loros JJ, Dunlap JC (1994) Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency. *Science* 263:1578–84. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8128244>
 48. Lowrey PL, Takahashi JS (2004) Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5:407–441. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.5.061903.175925>
 49. Takahashi JS, Hong H-K, Ko CH, McDearmon EL (2008) The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet* 9:764–775. <https://doi.org/10.1038/nrg2430>
 50. Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, et al (2001) Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107:855–67
 51. Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, et al (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110:251–60
 52. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, et al (2004) A Functional Genomics Strategy Reveals Rora as a Component of the Mammalian Circadian Clock. *Neuron* 43:527–537. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.018>
 53. Bollinger T, Schibler U (2014) Circadian rhythms – from genes to physiology and disease. *Swiss Med Wkly* 144:w13984. <https://doi.org/10.4414/smw.2014.13984>
 54. Padmanabhan K, Robles MS, Westerling T, Weitz CJ (2012) Feedback Regulation of Transcriptional Termination by the Mammalian Circadian Clock PERIOD Complex. *Science* (80-) 337:599–602. <https://doi.org/10.1126/science.1221592>
 55. Asher G, Gatfield D, Stratmann M, et al (2008) SIRT1 Regulates Circadian Clock Gene Expression through PER2 Deacetylation. *Cell* 134:317–328. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.050>
 56. Feng D, Liu T, Sun Z, et al (2011) A Circadian Rhythm Orchestrated by Histone Deacetylase 3 Controls Hepatic Lipid Metabolism. *Science* (80-) 331:1315–1319. <https://doi.org/10.1126/science.1198125>
 57. Stratmann M, Suter DM, Molina N, et al (2012) Circadian Dbp Transcription Relies on Highly Dynamic BMAL1-CLOCK Interaction with E Boxes and Requires the Proteasome. *Mol Cell* 48:277–287. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.012>
 58. Duong HA, Robles MS, Knutti D, Weitz CJ (2011) A Molecular Mechanism for Circadian Clock Negative Feedback. *Science* (80-) 332:1436–1439. <https://doi.org/10.1126/science.1196766>
 59. Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, et al (2008) The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* 134:329–340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.002>
 60. Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, et al (2002) Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol* 12:540–50
 61. Duffield GE, Best JD, Meurers BH, et al (2002) Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells. *Curr Biol* 12:551–7

62. Hughes ME, DiTacchio L, Hayes KR, et al (2009) Harmonics of Circadian Gene Transcription in Mammals. *PLoS Genet* 5:e1000442. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000442>
63. Miller BH, McDearmon EL, Panda S, et al (2007) Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci* 104:3342–3347. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611724104>
64. Panda S, Antoch MP, Miller BH, et al (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109:307–20
65. Storch K-F, Lipan O, Leykin I, et al (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 417:78–83. <https://doi.org/10.1038/nature744>
66. Geyfman M, Kumar V, Liu Q, et al (2012) Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1) controls circadian cell proliferation and susceptibility to UVB-induced DNA damage in the epidermis. *Proc Natl Acad Sci* 109:11758–11763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209592109>
67. Khapre R V., Kondratova AA, Susova O, Kondratov R V. (2011) Circadian clock protein BMAL1 regulates cellular senescence in vivo. *Cell Cycle* 10:4162–4169. <https://doi.org/10.4161/cc.10.23.18381>
68. Gallego M, Virshup DM (2007) Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:139. <https://doi.org/10.1038/nrm2106>
69. Grimaldi B, Bellet MM, Katada S, et al (2010) PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPAR γ . *Cell Metab* 12:509–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.10.005>
70. Lee JW, Hirota T, Peters EC, et al (2011) A small molecule modulates circadian rhythms through phosphorylation of the period protein. *Angew Chem Int Ed Engl* 50:10608–11. <https://doi.org/10.1002/anie.201103915>
71. Isojima Y, Nakajima M, Ukai H, et al (2009) CKIepsilon/delta-dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:15744–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908733106>
72. Etchegaray J-P, Lee C, Wade PA, Reppert SM (2003) Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature* 421:177–182. <https://doi.org/10.1038/nature01314>
73. Brown SA, Ripperger J, Kadener S, et al (2005) PERIOD1-associated proteins modulate the negative limb of the mammalian circadian oscillator. *Science* 308:693–6. <https://doi.org/10.1126/science.1107373>
74. Mehra A, Baker CL, Loros JJ, Dunlap JC (2009) Post-translational modifications in circadian rhythms. *Trends Biochem Sci* 34:483–490. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.06.006>
75. Lee J, Lee Y, Lee MJ, et al (2008) Dual modification of BMAL1 by SUMO2/3 and ubiquitin promotes circadian activation of the CLOCK/BMAL1 complex. *Mol Cell Biol* 28:6056–65. <https://doi.org/10.1128/MCB.00583-08>
76. Cardone L, Hirayama J, Giordano F, et al (2005) Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science* 309:1390–4. <https://doi.org/10.1126/science.1110689>
77. Asher G, Reinke H, Altmeyer M, et al (2010) Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Participates in the Phase Entrainment of Circadian Clocks to Feeding. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.016>
78. Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, et al (2000) Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 288:483–92
79. Meng Q-J, Logunova L, Maywood ES, et al (2008) Setting Clock Speed in Mammals: The CK1 ϵ tau Mutation in Mice Accelerates Circadian Pacemakers by Selectively Destabilizing PERIOD Proteins. *Neuron* 58:78–88. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.019>
80. Toh KL, Jones CR, He Y, et al (2001) An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* (80-) 291:1040–1043. <https://doi.org/10.1126/science.1057499>
81. Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, et al (2005) Functional consequences of a CKI δ mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature* 434:640–644. <https://doi.org/10.1038/nature03453>
82. Eide EJ, Woolf MF, Kang H, et al (2005) Control of Mammalian Circadian Rhythm by CKI -

- Regulated Proteasome-Mediated PER2 Degradation. *Mol Cell Biol* 25:2795–2807. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.7.2795-2807.2005>
83. Shirogane T, Jin J, Ang XL, Harper JW (2005) SCF^{β-TRCP} Controls Clock-dependent Transcription via Casein Kinase 1-dependent Degradation of the Mammalian Period-1 (Per1) Protein. *J Biol Chem* 280:26863–26872. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502862200>
84. Reischl S, Vanselow K, Westermarck PO, et al (2007) β-TrCP1-Mediated Degradation of PERIOD2 Is Essential for Circadian Dynamics. *J Biol Rhythms* 22:375–386. <https://doi.org/10.1177/0748730407303926>
85. Busino L, Bassermann F, Maiolica A, et al (2007) SCFFbx13 Controls the Oscillation of the Circadian Clock by Directing the Degradation of Cryptochrome Proteins. *Science* (80-) 316:900–904. <https://doi.org/10.1126/science.1141194>
86. Siepkka SM, Yoo S-H, Park J, et al (2007) Circadian Mutant Overtime Reveals F-box Protein FBXL3 Regulation of Cryptochrome and Period Gene Expression. *Cell* 129:1011–1023. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.030>
87. Godinho SIH, Maywood ES, Shaw L, et al (2007) The After-Hours Mutant Reveals a Role for Fbx13 in Determining Mammalian Circadian Period. *Science* (80-) 316:897–900. <https://doi.org/10.1126/science.1141138>
88. Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, et al (2000) Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103:1009–17
89. Vitaterna MH, King DP, Chang AM, et al (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* 264:719–25
90. DeBruyne JP, Noton E, Lambert CM, et al (2006) A Clock Shock: Mouse CLOCK Is Not Required for Circadian Oscillator Function. *Neuron* 50:465–477. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2006.03.041>
91. Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, et al (2001) Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell* 105:683–94
92. Bae K, Jin X, Maywood ES, et al (2001) Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron* 30:525–36
93. Cermakian N, Monaco L, Pando MP, et al (2001) Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the Period1 gene. *EMBO J* 20:3967–3974. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.15.3967>
94. Zheng B, Larkin DW, Albrecht U, et al (1999) The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* 400:169–173. <https://doi.org/10.1038/22118>
95. Vitaterna MH, Selby CP, Todo T, et al (1999) Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12114–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.21.12114>
96. Horst GTJ van der, Muijtjens M, Kobayashi K, et al (1999) Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398:627–630. <https://doi.org/10.1038/19323>
97. Thresher RJ, Vitaterna MH, Miyamoto Y, et al (1998) Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. *Science* 282:1490–4. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.282.5393.1490>
98. Rey G, Reddy AB (2013) Connecting cellular metabolism to circadian clocks. *Trends Cell Biol* 23:234–241. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.01.003>
99. Ramsey KM, Yoshino J, Brace CS, et al (2009) Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science* 324:651–654. <https://doi.org/10.1126/science.1171641>
100. Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, et al (2009) Circadian Control of the NAD⁺ Salvage Pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* (80-) 324:654. <https://doi.org/10.1126/science.1170803>
101. Rutter J, Reick M, Wu LC, McKnight SL (2001) Regulation of Clock and NPAS2 DNA Binding by the Redox State of NAD Cofactors. *Science* (80-) 293:510. <https://doi.org/10.1126/science.1060698>
102. Eckel-Mahan K, Sassone-Corsi P (2013) Metabolism and the circadian clock converge. *Physiol*

Rev 93:107–35. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2012>

103. O'Neill JS, Maywood ES, Chesham JE, et al (2008) cAMP-dependent signaling as a core component of the mammalian circadian pacemaker. *Science* 320:949–953. <https://doi.org/10.1126/science.1152506>
104. Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, et al (2009) AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* 326:437–440. <https://doi.org/10.1126/science.1172156>
105. Hirota T, Kon N, Itagaki T, et al (2010) Transcriptional repressor TIEG1 regulates Bmal1 gene through GC box and controls circadian clockwork. *Genes to Cells* 15:111–121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01371.x>
106. Nagoshi E, Saini C, Bauer C, et al (2004) Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* 119:693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.015>
107. Kondo T, Tsinoremas N, Golden S, et al (1994) Circadian clock mutants of cyanobacteria. *Science* (80-) 266:1233–1236. <https://doi.org/10.1126/science.7973706>
108. Dibner C, Sage D, Unser M, et al (2009) Circadian gene expression is resilient to large fluctuations in overall transcription rates. *EMBO J* 28:123–134. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.262>
109. Maywood ES, Chesham JE, O'Brien JA, Hastings MH (2011) A diversity of paracrine signals sustains molecular circadian cycling in suprachiasmatic nucleus circuits. *Proc Natl Acad Sci* 108:14306–14311. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101767108>
110. Nakajima M, Imai K, Ito H, et al (2005) Reconstitution of Circadian Oscillation of Cyanobacterial KaiC Phosphorylation in Vitro. *Science* (80-) 308:414. <https://doi.org/10.1126/science.1108451>
111. Edgar RS, Green EW, Zhao Y, et al (2012) Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* 485:459. <https://doi.org/10.1038/nature11088><https://www.nature.com/articles/nature11088#supplementary-information>
112. Sweeney BM, Haxo FT (1961) Persistence of a Photosynthetic Rhythm in Enucleated *Acetabularia*. *Science* (80-) 134:1361–1363. <https://doi.org/10.1126/science.134.3487.1361>
113. Radha E, Hill TD, Rao GHR, White JG (1985) Glutathione levels in human platelets display a circadian rhythm in vitro. *Thromb Res* 40:823–831. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(85\)90319-6](https://doi.org/10.1016/0049-3848(85)90319-6)
114. Reddy AB, Rey G (2014) Metabolic and nontranscriptional circadian clocks: eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 83:165–189. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035623>
115. Roenneberg T, Morse D (1993) Two circadian oscillators in one cell. *Nature* 362:362–364. <https://doi.org/10.1038/362362a0>
116. O'Neill JS, Reddy AB (2011) Circadian clocks in human red blood cells. *Nature* 469:498–503. <https://doi.org/10.1038/nature09702>
117. Zheng X, Sehgal A (2008) Probing the relative importance of molecular oscillations in the circadian clock. *Genetics* 178:1147–1155. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.088658>
118. Rosbash M (2009) The implications of multiple circadian clock origins. *PLoS Biol* 7:e62. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000062>
119. Allada R, Emery P, Takahashi JS, Rosbash M (2001) Stopping Time: The Genetics of Fly and Mouse Circadian Clocks. *Annu Rev Neurosci* 24:1091–1119. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1091>
120. Kojima S, Shingle DL, Green CB (2011) Post-transcriptional control of circadian rhythms. *J Cell Sci* 124:311–320. <https://doi.org/10.1242/jcs.065771>
121. O'Neill JS, van Ooijen G, Dixon LE, et al (2011) Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. *Nature* 469:554. <https://doi.org/10.1038/nature09654><https://www.nature.com/articles/nature09654#supplementary-information>
122. Wang M, Jiang Y-Y, Kim KM, et al (2011) A Universal Molecular Clock of Protein Folds and Its

- Power in Tracing the Early History of Aerobic Metabolism and Planet Oxygenation. *Mol Biol Evol* 28:567–582. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq232>
123. Crowe SA, Døssing LN, Beukes NJ, et al (2013) Atmospheric oxygenation three billion years ago. *Nature* 501:535. <https://doi.org/10.1038/nature12426><https://www.nature.com/articles/nature12426#supplementary-information>
124. Hall A, Karplus PA, Poole LB (2009) Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions. *FEBS J* 276:2469–2477. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06985.x>
125. Rhee SG, Jeong W, Chang TS, Woo HA (2007) Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance. *Kidney Int* 72:S3–S8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002380>
126. Peskin A V., Low FM, Paton LN, et al (2007) The High Reactivity of Peroxiredoxin 2 with H₂O₂ Is Not Reflected in Its Reaction with Other Oxidants and Thiol Reagents. *J Biol Chem* 282:11885–11892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700339200>
127. Chang T-S, Jeong W, Woo HA, et al (2004) Characterization of Mammalian Sulfiredoxin and Its Reactivation of Hyperoxidized Peroxiredoxin through Reduction of Cysteine Sulfinic Acid in the Active Site to Cysteine. *J Biol Chem* 279:50994–51001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409482200>
128. Gaglio D, Metallo CM, Gameiro PA, et al (2014) Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth. *Mol Syst Biol* 7:523–523. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.56>
129. Beloribi-Djefalia S, Vasseur S, Guillaumond F (2016) Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis* 5:e189–e189. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.49>
130. Huang J, Li L, Lian J, et al (2016) Tumor-Induced Hyperlipidemia Contributes to Tumor Growth. *Cell Rep* 15:336–348. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.03.020>
131. Hermansson M, Hokynar K, Somerharju P (2011) Mechanisms of glycerophospholipid homeostasis in mammalian cells. *Prog Lipid Res* 50:240–257. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.02.004>
132. Gimeno RE, Cao J (2008) Thematic review series: glycerolipids. Mammalian glycerol-3-phosphate acyltransferases: new genes for an old activity. *J Lipid Res* 49:2079–88. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800013-JLR200>
133. Coleman RA, Mashek DG (2011) Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling. *Chem Rev* 111:6359–86. <https://doi.org/10.1021/cr100404w>
134. Takeuchi K, Reue K (2009) Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Metab* 296:E1195–E1209. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90958.2008>
135. Kok BPC, Venkatraman G, Capatos D, Brindley DN (2012) Unlike Two Peas in a Pod: Lipid Phosphate Phosphatases and Phosphatidate Phosphatases. *Chem Rev* 112:5121–5146. <https://doi.org/10.1021/cr200433m>
136. KENNEDY EP, WEISS SB (1956) The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem* 222:193–214
137. Pavlovic Z, Bakovic M (2013) Regulation of Phosphatidylethanolamine Homeostasis — The Critical Role of CTP:Phosphoethanolamine Cytidylyltransferase (Pcyt2). *Int J Mol Sci* 14:2529–2550. <https://doi.org/10.3390/ijms14022529>
138. Zhu L, Bakovic M (2012) Breast cancer cells adapt to metabolic stress by increasing ethanolamine phospholipid synthesis and CTP:ethanolaminephosphate cytidylyltransferase-Pcyt2 activity. *Biochem Cell Biol* 90:188–199. <https://doi.org/10.1139/o11-081>
139. Acosta-Rodríguez VA, Márquez S, Salvador GA, et al (2013) Daily rhythms of glycerophospholipid synthesis in fibroblast cultures involve differential enzyme contributions. *J Lipid Res* 54:1798–1811. <https://doi.org/10.1194/jlr.M034264>
140. Kent C (1995) Eukaryotic Phospholipid Biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 64:315–343. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.001531>

141. Hjelmstad RH, Morash SC, McMaster CR, Bell RM (1994) Chimeric enzymes. Structure-function analysis of segments of sn-1,2-diacylglycerol choline- and ethanolaminephosphotransferases. *J Biol Chem* 269:20995–1002
142. Henneberry AL, Wistow G, McMaster CR (2000) Cloning, genomic organization, and characterization of a human cholinephosphotransferase. *J Biol Chem* 275:29808–15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005786200>
143. Henneberry AL, McMaster CR (1999) Cloning and expression of a human choline/ethanolaminephosphotransferase: synthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Biochem J* 339 (Pt 2):291–8
144. Walther TC, Farese R V. (2012) Lipid Droplets and Cellular Lipid Metabolism. *Annu Rev Biochem* 81:687–714. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061009-102430>
145. Murphy DJ (2001) The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 40:325–438
146. Krahmer N, Guo Y, Wilfling F, et al (2011) Phosphatidylcholine Synthesis for Lipid Droplet Expansion Is Mediated by Localized Activation of CTP:Phosphocholine Cytidyltransferase. *Cell Metab* 14:504–515. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.07.013>
147. Wilfling F, Haas JT, Walther TC, et al (2014) Lipid Droplet Biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 29:39. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2014.03.008>
148. Pol A, Gross SP, Parton RG (2014) Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. *J Cell Biol* 204:635–646. <https://doi.org/10.1083/jcb.201311051>
149. Yu J, Li P (2017) The size matters: regulation of lipid storage by lipid droplet dynamics. *Sci China Life Sci* 60:46–56. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0322-x>
150. Murphy S, Martin S, Parton RG (2010) Quantitative analysis of lipid droplet fusion: inefficient steady state fusion but rapid stimulation by chemical fusogens. *PLoS One* 5:e15030. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015030>
151. Guo Y, Walther TC, Rao M, et al (2008) Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature* 453:657–61. <https://doi.org/10.1038/nature06928>
152. Fei W, Shui G, Zhang Y, et al (2011) A role for phosphatidic acid in the formation of “supersized” lipid droplets. *PLoS Genet* 7:e1002201. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002201>
153. Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, et al (2012) FAT SIGNALS - Lipases and Lipolysis in Lipid Metabolism and Signaling. *Cell Metab* 15:279–291. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2011.12.018>
154. Kerner J, Hoppel C (2000) Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1486:1–17. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00044-5](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00044-5)
155. Eaton S (2002) Control of mitochondrial β -oxidation flux. *Prog Lipid Res* 41:197–239. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00024-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00024-8)
156. Krahmer N, Farese R V., Walther TC (2013) Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol Med* 5:973–983. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100671>
157. Hatanaka F, Matsubara C, Myung J, et al (2010) Genome-wide profiling of the core clock protein BMAL1 targets reveals a strict relationship with metabolism. *Mol Cell Biol* 30:5636–5648. <https://doi.org/10.1128/MCB.00781-10>
158. Rey G, Cesbron F, Rougemont J, et al (2011) Genome-wide and phase-specific DNA-binding rhythms of BMAL1 control circadian output functions in mouse liver. *PLoS Biol* 9:e1000595. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000595>
159. Bugge A, Feng D, Everett LJ, et al (2012) Rev-erb α and Rev-erb β coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes Dev* 26:657–67. <https://doi.org/10.1101/gad.186858.112>
160. Cho H, Zhao X, Hatori M, et al (2012) Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β . *Nature* 485:123–127. <https://doi.org/10.1038/nature11048>
161. Koike N, Yoo S-H, Huang H-C, et al (2012) Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science* 338:349–54.

<https://doi.org/10.1126/science.1226339>

162. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, et al (2005) Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice. *Science* (80-) 308:1043–1045. <https://doi.org/10.1126/science.1108750>
163. Bunker MK, Walisser JA, Sullivan R, et al (2005) Progressive arthropathy in mice with a targeted disruption of the *Mop3/Bmal-1* locus. *genesis* 41:122–132. <https://doi.org/10.1002/gene.20102>
164. Rudic RD, McNamara P, Curtis A-M, et al (2004) *BMAL1* and *CLOCK*, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol* 2:e377. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020377>
165. Shimba S, Ogawa T, Hitosugi S, et al (2011) Deficient of a Clock Gene, Brain and Muscle Arnt-Like Protein-1 (*BMAL1*), Induces Dyslipidemia and Ectopic Fat Formation. *PLoS One* 6:e25231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025231>
166. Lamia KA, Papp SJ, Yu RT, et al (2011) Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. *Nature* 480:552–6. <https://doi.org/10.1038/nature10700>
167. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144:646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
168. Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, et al (1997) Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev* 23:35–61
169. Stupp R, Gander M, Leyvraz S, Newlands E (2001) Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours. *Lancet Oncol* 2:552–560. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(01\)00489-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(01)00489-2)
170. Yung WKA, Albright RE, Olson J, et al (2000) A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Br J Cancer* 83:588–593. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1316>
171. Wick W, Platten M, Wick A, et al (2016) Current status and future directions of anti-angiogenic therapy for gliomas. *Neuro Oncol* 18:315–328. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov180>
172. Chinot OL, Wick W, Mason W, et al (2014) Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N Engl J Med* 370:709–722. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1308345>
173. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, et al (2014) A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N Engl J Med* 370:699–708. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1308573>
174. Martini M, Vecchione L, Siena S, et al (2012) Targeted therapies: how personal should we go? *Nat Rev Clin Oncol* 9:87–97. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.164>
175. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al (2005) Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
176. Lévi F (2001) Circadian chronotherapy for human cancers. *Lancet Oncol* 2:307–15. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(00\)00326-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00326-0)
177. Takahashi JS, Hong H-K, Ko CH, McDearmon EL (2008) The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet* 9:764–775. <https://doi.org/10.1038/nrg2430>
178. Green CB, Takahashi JS, Bass J (2008) The meter of metabolism. *Cell* 134:728–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.022>
179. Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J (2011) Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest* 121:2133–2141. <https://doi.org/10.1172/JCI46043>
180. Huang X-L, Fu C-J, Bu R-F (2011) Role of Circadian Clocks in the Development and Therapeutics of Cancer. *J Int Med Res* 39:2061–2066. <https://doi.org/10.1177/147323001103900601>
181. Laposky AD, Bass J, Kohsaka A, Turek FW (2008) Sleep and circadian rhythms: Key components in the regulation of energy metabolism. *FEBS Lett* 582:142–151. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.079>
182. Kubo T, Ozasa K, Mikami K, et al (2006) Prospective Cohort Study of the Risk of Prostate Cancer among Rotating-Shift Workers: Findings from the Japan Collaborative Cohort Study. *Am J Epidemiol*

- 164:549–555. <https://doi.org/10.1093/aje/kwj232>
183. Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, et al (2003) Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst* 95:825–8
184. Viswanathan AN, Hankinson SE, Schernhammer ES (2007) Night Shift Work and the Risk of Endometrial Cancer. *Cancer Res* 67:10618–10622. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2485>
185. Lahti TA, Partonen T, Kyyrönen P, et al (2008) Night-time work predisposes to non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 123:2148–2151. <https://doi.org/10.1002/ijc.23566>
186. Stevens RG (2009) Working against our endogenous circadian clock: Breast cancer and electric lighting in the modern world. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 680:106–108. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2009.08.004>
187. Touitou Y, Bogdan A, Lévi F, et al (1996) Disruption of the circadian patterns of serum cortisol in breast and ovarian cancer patients: relationships with tumour marker antigens. *Br J Cancer* 74:1248–52. <https://doi.org/10.1038/bjc.1996.524>
188. Panzer A (1997) Melatonin in osteosarcoma: an effective drug? *Med Hypotheses* 48:523–5
189. Skibola CF, Holly EA, Forrest MS, et al (2004) Body Mass Index, Leptin and Leptin Receptor Polymorphisms, and Non-Hodgkin Lymphoma
190. Viswanathan AN, Schernhammer ES (2009) Circulating melatonin and the risk of breast and endometrial cancer in women. *Cancer Lett* 281:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.11.002>
191. Kloog I, Haim A, Stevens RG, Portnov BA (2009) Global Co-Distribution of Light at Night (LAN) and Cancers of Prostate, Colon, and Lung in Men. *Chronobiol Int* 26:108–125. <https://doi.org/10.1080/07420520802694020>
192. Knutsson A, Alfredsson L, Karlsson B, et al (2013) Breast cancer among shift workers: results of the WOLF longitudinal cohort study. *Scand J Work Environ Health* 39:170–7. <https://doi.org/10.5271/sjweh.3323>
193. Bhatti P, Mirick DK, Davis S (2012) Invited Commentary: Shift Work and Cancer. *Am J Epidemiol* 176:760–763. <https://doi.org/10.1093/aje/kws311>
194. Haus EL, Smolensky MH (2013) Shift work and cancer risk: Potential mechanistic roles of circadian disruption, light at night, and sleep deprivation. *Sleep Med Rev* 17:273–284. <https://doi.org/10.1016/J.SMRV.2012.08.003>
195. Buzzelli G, Dattolo P, Pinzani M, et al (1993) Circulating growth hormone and insulin-like growth factor-I in nonalcoholic liver cirrhosis with or without superimposed hepatocarcinoma: evidence of an altered circadian rhythm. *Am J Gastroenterol* 88:1744–8
196. Davis S, Mirick DK (2006) Circadian Disruption, Shift Work and the Risk of Cancer: A Summary of the Evidence and Studies in Seattle. *Cancer Causes Control* 17:539–545. <https://doi.org/10.1007/s10552-005-9010-9>
197. Rafnsson V, Tulinius H, Jónasson JG, Hrafnkelsson J (2001) Risk of breast cancer in female flight attendants: a population-based study (Iceland). *Cancer Causes Control* 12:95–101
198. Straif K, Baan R, Grosse Y, et al (2007) Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting. *Lancet Oncol* 8:1065–1066. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(07\)70373-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70373-X)
199. Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, et al (2001) Rotating Night Shifts and Risk of Breast Cancer in Women Participating in the Nurses' Health Study. *JNCI J Natl Cancer Inst* 93:1563–1568. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.20.1563>
200. Stevens RG, Hansen J, Costa G, et al (2011) Considerations of circadian impact for defining “shift work” in cancer studies: IARC Working Group Report. *Occup Environ Med* 68:154–162. <https://doi.org/10.1136/oem.2009.053512>
201. Pukkala E, Aspholm R, Auvinen A, et al (2003) Cancer incidence among 10,211 airline pilots: a Nordic study. *Aviat Space Environ Med* 74:699–706
202. Lie J-AS, Roessink J, Kjærheim K (2006) Breast Cancer and Night Work among Norwegian Nurses. *Cancer Causes Control* 17:39–44. <https://doi.org/10.1007/s10552-005-3639-2>
203. Knutsson A, Alfredsson L, Karlsson B, et al (2013) Breast cancer among shift workers: results of the WOLF longitudinal cohort study. *Scand J Work Environ Health* 39:170–7.

<https://doi.org/10.5271/sjweh.3323>

204. Papantoniou K, Castaño-Vinyals G, Espinosa A, et al (2015) Night shift work, chronotype and prostate cancer risk in the MCC-Spain case-control study. *Int J Cancer* 137:1147–1157. <https://doi.org/10.1002/ijc.29400>
205. Kakizaki M, Inoue K, Kuriyama S, et al (2008) Sleep duration and the risk of prostate cancer: the Ohsaki Cohort Study. *Br J Cancer* 99:176–8. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604425>
206. Mostafaie N, Kállay E, Sauerzapf E, et al (2009) Correlated downregulation of estrogen receptor beta and the circadian clock gene Per1 in human colorectal cancer. *Mol Carcinog* 48:642–647. <https://doi.org/10.1002/mc.20510>
207. Winter SL, Bosnoyan-Collins L, Pinnaduwege D, Andrulis IL (2007) Expression of the circadian clock genes Per1 and Per2 in sporadic and familial breast tumors. *Neoplasia* 9:797–800
208. Xia H, Niu Z, Ma H, et al (2010) Deregulated expression of the Per1 and Per2 in human gliomas. *Can J Neurol Sci* 37:365–70
209. Fujioka A, Takashima N, Shigeoyoshi Y (2006) Circadian rhythm generation in a glioma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 346:169–174. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2006.05.094>
210. Chen S-T, Choo K-B, Hou M-F, et al (2005) Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers. *Carcinogenesis* 26:1241–1246. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi075>
211. Jung-Hynes B, Huang W, Reiter RJ, Ahmad N (2010) Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells. *J Pineal Res* 49:no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00767.x>
212. Oda A, Katayose Y, Yabuuchi S, et al (2009) Clock gene mouse period2 overexpression inhibits growth of human pancreatic cancer cells and has synergistic effect with cisplatin. *Anticancer Res* 29:1201–9
213. Pogue-Geile KL, Lyons-Weiler J, Whitcomb DC (2006) Molecular overlap of fly circadian rhythms and human pancreatic cancer. *Cancer Lett* 243:55–57. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.11.049>
214. Hsu C-M, Lin S-F, Lu C-T, et al (2012) Altered expression of circadian clock genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumor Biol* 33:149–155. <https://doi.org/10.1007/s13277-011-0258-2>
215. Lin Y-M, Chang JH, Yeh K-T, et al (2008) Disturbance of circadian gene expression in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 47:925–933. <https://doi.org/10.1002/mc.20446>
216. Cao Q, Gery S, Dashti A, et al (2009) A Role for the Clock Gene Per1 in Prostate Cancer. *Cancer Res* 69:7619–7625. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4199>
217. Fu L, Pelicano H, Liu J, et al (2002) The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* 111:41–50
218. Gery S, Komatsu N, Baldjyan L, et al (2006) The Circadian Gene Per1 Plays an Important Role in Cell Growth and DNA Damage Control in Human Cancer Cells. *Mol Cell* 22:375–382. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.038>
219. Sun C, Huang S, Zeng J, et al (2010) Per2 Inhibits K562 Leukemia Cell Growth In Vitro and In Vivo Through Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induction. *Pathol Oncol Res* 16:403–411. <https://doi.org/10.1007/s12253-009-9227-0>
220. Shih M-C, Yeh K-T, Tang K-P, et al (2006) Promoter methylation in circadian genes of endometrial cancers detected by methylation-specific PCR. *Mol Carcinog* 45:732–740. <https://doi.org/10.1002/mc.20198>
221. Taniguchi H, Fernandez AF, Setien F, et al (2009) Epigenetic Inactivation of the Circadian Clock Gene BMAL1 in Hematologic Malignancies. *Cancer Res* 69:8447–8454. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0551>
222. Chu LW, Zhu Y, Yu K, et al (2007) Variants in circadian genes and prostate cancer risk: a population-based study in China. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 11:342. <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4501024>
223. Dai H, Zhang L, Cao M, et al (2011) The role of polymorphisms in circadian pathway genes in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat* 127:531–540. <https://doi.org/10.1007/s10549-010->

1231-2

224. Zhu Y, Stevens RG, Hoffman AE, et al (2009) Testing the circadian gene hypothesis in prostate cancer: a population-based case-control study. *Cancer Res* 69:9315–9322. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0648>
225. Zhou F, He X, Liu H, et al (2012) Functional polymorphisms of circadian positive feedback regulation genes and clinical outcome of Chinese patients with resected colorectal cancer. *Cancer* 118:937–946. <https://doi.org/10.1002/cncr.26348>
226. Antoch MP, Gorbacheva VY, Vykhovanets O, et al (2008) Disruption of the circadian clock due to the Clock mutation has discrete effects on aging and carcinogenesis. *Cell Cycle* 7:1197–204. <https://doi.org/10.4161/cc.7.9.5886>
227. Lamia KA, Storch K-F, Weitz CJ (2008) Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci* 105:15172–15177. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806717105>
228. Shimba S, Ishii N, Ohta Y, et al (2005) Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 102:12071–12076. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502383102>
229. Lee S, Donehower LA, Herron AJ, et al (2010) Disrupting Circadian Homeostasis of Sympathetic Signaling Promotes Tumor Development in Mice. *PLoS One* 5:e10995. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010995>
230. Ozturk N, Lee JH, Gaddameedhi S, Sancar A (2009) Loss of cryptochrome reduces cancer risk in *p53* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci* 106:2841–2846. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813028106>
231. Raspé E, Duez H, Mansén A, et al (2002) Identification of Rev-erb α as a physiological repressor of apoC-III gene transcription. *J Lipid Res* 43:2172–9. <https://doi.org/10.1194/jlr.m200386-jlr200>
232. Halberg F (1973) Chronobiology and its promise for health care and environmental integrity. *Int J Chronobiol* 1:10–4
233. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Gaddameedhi S, et al (2015) Circadian clock, cancer, and chemotherapy. *Biochemistry* 54:110–23. <https://doi.org/10.1021/bi5007354>
234. Selfridge JM, Gotoh T, Schiffhauer S, et al (2016) Chronotherapy: Intuitive, Sound, Founded...But Not Broadly Applied. *Drugs* 76:1507–1521. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0646-4>
235. Yang K, Chen D, Cheng J, et al (2013) Retrospective analysis of chronomodulated chemotherapy versus conventional chemotherapy with paclitaxel, carboplatin, and 5-fluorouracil in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Onco Targets Ther* 6:1507. <https://doi.org/10.2147/OTT.S53098>
236. Bajetta E, Pietrantonio F, Buzzoni R, et al (2014) Chronomodulated capecitabine and adjuvant radiation in intermediate-risk to high-risk rectal cancer: a phase II study. *Am J Clin Oncol* 37:545–9. <https://doi.org/10.1097/COC.0b013e31827ecd1d>
237. Tanaka K, Yabushita Y, Nakagawa K, Endo I (2013) [Circadian chronotherapy for metastatic liver tumor]. *Nihon Rinsho* 71:2158–64
238. Comerford SA, Huang Z, Du X, et al (2014) Acetate Dependence of Tumors. *Cell* 159:1591–1602. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.11.020>
239. Schug ZT, Peck B, Jones DT, et al (2015) Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. *Cancer Cell* 27:57–71. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.12.002>
240. Sulli G, Rommel A, Wang X, et al (2018) Pharmacological activation of REV-ERBs is lethal in cancer and oncogene-induced senescence. *Nature* 553:351–355. <https://doi.org/10.1038/nature25170>
241. Lévi F, Okyar A (2011) Circadian clocks and drug delivery systems: impact and opportunities in chronotherapeutics. *Expert Opin Drug Deliv* 8:1535–1541. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.618184>
242. Roche VP, Mohamad-Djafari A, Innominato PF, et al (2014) Thoracic surface temperature

- rhythms as circadian biomarkers for cancer chronotherapy. *Chronobiol Int* 31:409–420. <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.864301>
243. Li X-M, Mohammad-Djafari A, Dumitru M, et al (2013) A Circadian Clock Transcription Model for the Personalization of Cancer Chronotherapy. *Cancer Res* 73:7176–7188. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1528>
244. Pagani L, Schmitt K, Meier F, et al (2011) Serum factors in older individuals change cellular clock properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:7218–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008882108>
245. Azzi A, Dallmann R, Casserly A, et al (2014) Circadian behavior is light-reprogrammed by plastic DNA methylation. *Nat Neurosci* 17:377–382. <https://doi.org/10.1038/nn.3651>
246. Hu Y, Shmygelska A, Tran D, et al GWAS of 89,283 individuals identifies genetic variants associated with self-reporting of being a morning person. *nature.com*
247. Filipski E, Subramanian P, Carrière J, et al (2009) Circadian disruption accelerates liver carcinogenesis in mice. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 680:95–105. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.10.002>
248. Ballesta A, Clairambault J, Dulong S, et al A Systems Biomedicine Approach for Chronotherapeutics Optimization: Focus on the Anticancer Drug Irinotecan. https://doi.org/10.1007/978-88-470-2571-4_16
249. Dulong S, Ballesta A, Okyar A, Levi F (2015) Identification of Circadian Determinants of Cancer Chronotherapy through In Vitro Chronopharmacology and Mathematical Modeling. *Mol Cancer Ther* 14:2154–2164. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0129>
250. Giacchetti S, Cure H, Adenis A, et al (2001) Chronomodulated (Chrono) irinotecan (CPT) versus standard (STD) infusion in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (MCC), a randomized multicenter trial. *Eur J Cancer* 37:S309. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)81635-X](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)81635-X)
251. Lévi F, Zidani R, Misset JL (1997) Randomised multicentre trial of chronotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid in metastatic colorectal cancer. *International Organization for Cancer Chronotherapy. Lancet (London, England)* 350:681–6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)03358-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)03358-8)
252. Zeng Z-L, Luo H-Y, Yang J, et al (2014) Overexpression of the Circadian Clock Gene Bmal1 Increases Sensitivity to Oxaliplatin in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 20:. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0171>
253. Garbarino-Pico E, Carpentieri AR, Castagnet PI, et al (2004) Synthesis of retinal ganglion cell phospholipids is under control of an endogenous circadian clock: Daily variations in phospholipid-synthesizing enzyme activities. *J Neurosci Res* 76:642–652. <https://doi.org/10.1002/jnr.20126>
254. Garbarino-Pico E, Carpentieri AR, Contin MA, et al (2004) Retinal ganglion cells are autonomous circadian oscillators synthesizing N-acetylserotonin during the day. *J Biol Chem* 279:51172–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309248200>
255. Gorné LD, Acosta-Rodríguez VA, Pasquaré SJ, et al (2015) The mouse liver displays daily rhythms in the metabolism of phospholipids and in the activity of lipid synthesizing enzymes. *Chronobiol Int* 32:11–26. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.949734>
256. Portal MM, Ferrero GO, Caputto BL (2007) N-Terminal c-Fos tyrosine phosphorylation regulates c-Fos/ER association and c-Fos-dependent phospholipid synthesis activation. *Oncogene* 26:3551–3558. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210137>
257. Cichowski K, Shih TS, Schmitt E, et al (1999) Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. *Science* 286:2172–6
258. Reilly KM, Loisel DA, Bronson RT, et al (2000) Nf1;Trp53 mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects. *Nat Genet* 26:109–113. <https://doi.org/10.1038/79075>
259. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–54
260. Morera LP, Díaz NM, Guido ME (2016) Horizontal cells expressing melanopsin x are novel photoreceptors in the avian inner retina. *Proc Natl Acad Sci* 113:13215–13220. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608901113>

261. Eruslanov E, Kusmartsev S (2010) Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). pp 57–72
262. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
263. Fuchs B, Süß R, Teuber K, et al (2011) Lipid analysis by thin-layer chromatography—A review of the current state. *J Chromatogr A* 1218:2754–2774. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.066>
264. Churchward MA, Brandman DM, Rogasevskaia T, Coorsen JR (2008) Copper (II) sulfate charring for high sensitivity on-plate fluorescent detection of lipids and sterols: quantitative analyses of the composition of functional secretory vesicles. *J Chem Biol* 1:79–87. <https://doi.org/10.1007/s12154-008-0007-1>
265. Pasquaré SJ, Giusto NM (1993) Differential properties of phosphatidate phosphohydrolase and diacylglyceride lipase activities in retinal subcellular fractions and rod outer segments. *Comp Biochem Physiol B* 104:141–8
266. Pasquaré de García SJ, Giusto NM (1986) Phosphatidate phosphatase activity in isolated rod outer segment from bovine retina. *Biochim Biophys Acta* 875:195–202
267. Giusto NM, Bazán NG (1979) Phospholipids and acylglycerols biosynthesis and ^{14}C production from [^{14}C]glycerol in the bovine retina: the effects of incubation time, oxygen and glucose. *Exp Eye Res* 29:155–68
268. Vlachostergios PJ, Hatzidaki E, Stathakis NE, et al (2013) Bortezomib Downregulates MGMT Expression in T98G Glioblastoma Cells. *Cell Mol Neurobiol* 33:313–318. <https://doi.org/10.1007/s10571-013-9910-2>
269. Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8:2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
270. Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD (1985) Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100:965–973. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.3.965>
271. Liu Y, Ludes-Meyers J, Zhang Y, et al (2002) Inhibition of AP-1 transcription factor causes blockade of multiple signal transduction pathways and inhibits breast cancer growth. *Oncogene* 21:7680–7689. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205883>
272. Sunwoo JB, Chen Z, Dong G, et al (2001) Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 7:1419–28
273. Nakagawa S, Schielzeth H (2013) A general and simple method for obtaining R^2 from generalized linear mixed-effects models. *Methods Ecol Evol* 4:133–142. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210x.2012.00261.x>
274. Thaben PF, Westermark PO (2014) Detecting rhythms in time series with RAIN. *J Biol Rhythms* 29:391–400. <https://doi.org/10.1177/0748730414553029>
275. Wagner PM, Sosa Alderete LG, Gorné LD, et al (2018) Proliferative Glioblastoma Cancer Cells Exhibit Persisting Temporal Control of Metabolism and Display Differential Temporal Drug Susceptibility in Chemotherapy. *Mol Neurobiol*. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1152-3>
276. Kane RC (2003) Velcade(R): U.S. FDA Approval for the Treatment of Multiple Myeloma Progressing on Prior Therapy. *Oncologist* 8:508–513. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.8-6-508>
277. Wang Y, Kojetin D, Burris TP (2015) Anti-proliferative actions of a synthetic REV-ERB α/β agonist in breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 96:315–322. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.06.010>
278. Circu ML, Aw TY (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48:749–62. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>
279. Wu D, Cederbaum AI (2003) Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* 27:277–84
280. Kiessling S, Beaulieu-Laroche L, Blum ID, et al (2017) Enhancing circadian clock function in cancer cells inhibits tumor growth. *BMC Biol* 15:13. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0349-7>
281. Zhang EE, Liu AC, Hirota T, et al (2009) A Genome-wide RNAi Screen for Modifiers of the

- Circadian Clock in Human Cells. *Cell* 139:199–210. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.031>
282. Lee Y, Jang AR, Francey LJ, et al (2015) KPNB1 mediates PER/CRY nuclear translocation and circadian clock function. *Elife* 4:. <https://doi.org/10.7554/eLife.08647>
283. Bai L, Lee Y, Hsu CT, et al (2018) A Conserved Circadian Function for the Neurofibromatosis 1 Gene. *Cell Rep* 22:3416–3426. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.014>
284. Zhanfeng N, Yanhui L, Zhou F, et al (2015) Circadian genes Per1 and Per2 increase radiosensitivity of glioma in vivo. *Oncotarget* 6:9951–8. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3179>
285. Bass J, Takahashi JS (2010) Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* 330:1349–1354. <https://doi.org/10.1126/science.1195027>
286. Ray S, Reddy AB (2016) Cross-talk between circadian clocks, sleep-wake cycles, and metabolic networks: Dispelling the darkness. *BioEssays* 38:394–405. <https://doi.org/10.1002/bies.201500056>
287. Brindley DN (2004) Lipid phosphate phosphatases and related proteins: Signaling functions in development, cell division, and cancer. *J Cell Biochem* 92:900–912. <https://doi.org/10.1002/jcb.20126>
288. Gréchez-Cassiau A, Feillet C, Guérin S, Delaunay F (2015) The hepatic circadian clock regulates the choline kinase α gene through the BMAL1-REV-ERB α axis. *Chronobiol Int* 32:774–784. <https://doi.org/10.3109/07420528.2015.1046601>
289. Wang TA, Yu Y V, Govindaiah G, et al (2012) Circadian rhythm of redox state regulates excitability in suprachiasmatic nucleus neurons. *Science* 337:839–42. <https://doi.org/10.1126/science.1222826>
290. Sundar IK, Sellix MT, Rahman I (2018) Redox regulation of circadian molecular clock in chronic airway diseases. *Free Radic Biol Med* 119:121–128. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2017.10.383>
291. Wang Y, Pati P, Xu Y, et al (2016) Endotoxin Disrupts Circadian Rhythms in Macrophages via Reactive Oxygen Species. *PLoS One* 11:e0155075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155075>
292. Pekovic-Vaughan V, Gibbs J, Yoshitane H, et al (2014) The circadian clock regulates rhythmic activation of the NRF2/glutathione-mediated antioxidant defense pathway to modulate pulmonary fibrosis. *Genes Dev* 28:548–560. <https://doi.org/10.1101/gad.237081.113>
293. Zhu B, Zhang Q, Pan Y, et al (2017) A Cell-Autonomous Mammalian 12 hr Clock Coordinates Metabolic and Stress Rhythms. *Cell Metab* 25:1305-1319.e9. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2017.05.004>
294. Calatayud CA, García CI, Paez PM, et al (2009) Partial inhibition of the proteasome enhances the activity of the myelin basic protein promoter. *Dev Neurosci* 31:169–80. <https://doi.org/10.1159/000193393>
295. Piperdi B, Ling Y-H, Liebes L, et al (2011) Bortezomib: Understanding the Mechanism of Action. *Mol Cancer Ther* 10:2029–2030. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0745>
296. Slat EA, Sponagel J, Marpegan L, et al (2017) Cell-intrinsic, Bmal1-dependent Circadian Regulation of Temozolomide Sensitivity in Glioblastoma. *J Biol Rhythms* 32:121–129. <https://doi.org/10.1177/0748730417696788>
297. Kim T (2012) Bortezomib induces G2-M arrest in human colon cancer cells through ROS-inducible phosphorylation of ATM-CHK1. *Int J Oncol*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1448>
298. Ling Y-H, Liebes L, Zou Y, Perez-Soler R (2003) Reactive Oxygen Species Generation and Mitochondrial Dysfunction in the Apoptotic Response to Bortezomib, a Novel Proteasome Inhibitor, in Human H460 Non-small Cell Lung Cancer Cells*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302559200>
299. Yu C, Rahmani M, Dent P, Grant S (2004) The hierarchical relationship between MAPK signaling and ROS generation in human leukemia cells undergoing apoptosis in response to the proteasome inhibitor Bortezomib. *Exp Cell Res* 295:555–566. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.02.001>
300. Fu L, Pelicano H, Liu J, et al (2002) The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* 111:41–50
301. Fu L, Lee CC (2003) The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nat Rev Cancer* 3:350–361. <https://doi.org/10.1038/nrc1072>
302. Jiang W, Zhao S, Jiang X, et al (2016) The circadian clock gene Bmal1 acts as a potential anti-

- oncogene in pancreatic cancer by activating the p53 tumor suppressor pathway. *Cancer Lett* 371:314–325. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2015.12.002>
303. Solt LA, Wang Y, Banerjee S, et al (2012) Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature* 485:62–8. <https://doi.org/10.1038/nature11030>
304. Scheiermann C, Kunisaki Y, Frenette PS (2013) Circadian control of the immune system. *Nat Rev Immunol* 13:190–8. <https://doi.org/10.1038/nri3386>
305. Wolcott E, Sebt Y, Solt LA, et al (2013) Rev-erb- α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat Med* 19:1039–46. <https://doi.org/10.1038/nm.3213>
306. Vieira E, Marroquí L, Batista TM, et al (2012) The clock gene Rev-erb α regulates pancreatic β -cell function: modulation by leptin and high-fat diet. *Endocrinology* 153:592–601. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1595>
307. Swinnen J V, Brusselmans K, Verhoeven G (2006) Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9:358–365. <https://doi.org/10.1097/01.mco.0000232894.28674.30>
308. Menendez JA, Lupu R (2007) Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 7:763–777. <https://doi.org/10.1038/nrc2222>
309. Bensaad K, Favaro E, Lewis CA, et al (2014) Fatty Acid Uptake and Lipid Storage Induced by HIF-1 α Contribute to Cell Growth and Survival after Hypoxia-Reoxygenation. *Cell Rep* 9:349–365. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.056>
310. Hafez IM, Cullis PR (2001) Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 47:139–148. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00103-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00103-X)
311. Lacal JC, Campos JM (2015) Preclinical Characterization of RSM-932A, a Novel Anticancer Drug Targeting the Human Choline Kinase Alpha, an Enzyme Involved in Increased Lipid Metabolism of Cancer Cells. *Mol Cancer Ther* 14:31–39. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0531>
312. Burris TP (2008) Nuclear Hormone Receptors for Heme: REV-ERB α and REV-ERB β Are Ligand-Regulated Components of the Mammalian Clock. *Mol Endocrinol* 22:1509–1520. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0519>
313. Yin L, Wu N, Lazar MA (2010) Nuclear Receptor Rev-Erb α : A Heme Receptor that Coordinates Circadian Rhythm and Metabolism. *Nucl Recept Signal* 8:nrs.08001. <https://doi.org/10.1621/nrs.08001>
314. Duez H, Staels B (2009) Rev-erb- α : an integrator of circadian rhythms and metabolism. *J Appl Physiol* 107:1972–80. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00570.2009>
315. Spoelstra K, Wikelski M, Daan S, et al (2016) Natural selection against a circadian clock gene mutation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:686–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516442113>
316. Halberg F, Johnson EA, Brown BW, Bittner JJ (1960) Susceptibility Rhythm to E. coli Endotoxin and Bioassay. *Exp Biol Med* 103:142–144. <https://doi.org/10.3181/00379727-103-25439>
317. Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, O'Neill LAJ (2014) Circadian clock proteins and immunity. *Immunity* 40:178–86. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.02.002>
318. Man K, Loudon A, Chawla A (2016) Immunity around the clock. *Science* 354:999–1003. <https://doi.org/10.1126/science.aah4966>
319. Labrecque N, Cermakian N (2015) Circadian Clocks in the Immune System. *J Biol Rhythms* 30:277–290. <https://doi.org/10.1177/0748730415577723>
320. Arjona A, Boyadjieva N, Sarkar DK (2004) Circadian Rhythms of Granzyme B, Perforin, IFN- γ , and NK Cell Cytolytic Activity in the Spleen: Effects of Chronic Ethanol. *J Immunol* 172:2811–2817. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2811>
321. Terao K, Suzuki J, Ohkura S (2002) Circadian rhythm in circulating CD16-positive natural killer (NK) cells in macaque monkeys, implication of plasma cortisol levels. *Primates* 43:329–38
322. Druzd D, Matveeva O, Ince L, et al (2017) Lymphocyte Circadian Clocks Control Lymph Node Trafficking and Adaptive Immune Responses. *Immunity* 46:120–132. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.12.011>

323. Marpegan L, Leone MJ, Katz ME, et al (2009) DIURNAL VARIATION IN ENDOTOXIN-INDUCED MORTALITY IN MICE: CORRELATION WITH PROINFLAMMATORY FACTORS. *Chronobiol Int* 26:1430–1442. <https://doi.org/10.3109/07420520903408358>
324. Scheiermann C, Kunisaki Y, Lucas D, et al (2012) Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity* 37:290–301. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.021>
325. Antoch MP, Toshkov I, Kuropatwinski KK, Jackson M (2013) Deficiency in PER proteins has no effect on the rate of spontaneous and radiation-induced carcinogenesis. *Cell Cycle* 12:3673–80. <https://doi.org/10.4161/cc.26614>
326. Puram R V, Kowalczyk MS, De Boer CG, et al (2016) Core Circadian Clock Genes Regulate Leukemia Stem Cells in AML In Brief Disruption of the circadian rhythm machinery in AML produces anti-leukemic effects, including differentiation and depletion of disease-propagating leukemia stem cells. Accession Numbers GSE70686. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.015>
327. Matsuo T (2003) Control Mechanism of the Circadian Clock for Timing of Cell Division in Vivo. *Science* (80-) 302:255–259. <https://doi.org/10.1126/science.1086271>
328. Tang Q, Cheng B, Xie M, et al (2017) Circadian Clock Gene *Bmal1* Inhibits Tumorigenesis and Increases Paclitaxel Sensitivity in Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res* 77:532–544. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1322>
329. Razorenova O V. (2012) Brain and muscle ARNT-like protein BMAL1 regulates ROS homeostasis and senescence: A possible link to hypoxia-inducible factor-mediated pathway. *Cell Cycle* 11:213–213. <https://doi.org/10.4161/cc.11.2.18786>

ÍNDICES

Índice de Figuras

Figura 1: Marcadores gliales en células T98G en cultivo.....	45
Figura 2: Distribución del ciclo celular dependiendo de la condición de cultivo.	46
Figura 3: Expresión de los genes <i>Bmal1</i> y <i>Per1</i> en células T98G y T98G E1.	47
Figura 4: Variación temporal de PER1.....	48
Figura 5: Composición temporal del contenido lipídico en células T98G sincronizadas.....	49
Figura 6: Variación temporal del contenido lipídico en células T98G sincronizadas.....	50
Figura 7: Variación temporal de la actividad <i>in vitro</i> de la enzima PAP en células T98G sincronizadas.	51
Figura 8: Variación temporal del estado redox en células T98G.....	52
Figura 9: Variación temporal del estado redox en la población T98G E1.....	53
Figura 10: Variación temporal en la expresión de peroxirredoxinas.	54
Figura 11: Respuesta diferencial al tratamiento con BOR en células T98G.....	55
Figura 12: Niveles de ROS en células tratadas con BOR.....	56
Figura 13: Viabilidad de células T98G tratadas con el agonista SR9009.	57
Figura 14: Respuesta diferencial en el tratamiento con SR9009 en células T98G.	57
Figura 15: Expresión de REV-ERB y GFAP en células T98G control y tratadas con el agonista SR9009.	58
Figura 16: Distribución del ciclo celular en células T98G tratadas con el agonista SR9009.	59
Figura 17: Determinación del tamaño de GLs en células T98G mediante microscopia confocal.	60
Figura 18: Determinación de la intensidad de fluorescencia de GLs en células T98G mediante citometría de flujo.	60
Figura 19: Determinación de ROS en células T98G tratadas con el agonista SR9009.	61
Figura 20: Periodos de oscilaciones transcripcionales y metabólicas en cultivos de células T98G.....	63
Figura 21: Esquema representativo de los resultados obtenidos en relación a las oscilaciones metabólicas y susceptibilidad a drogas antitumorales en células T98G en cultivo.	69
Figura 22: Expresión de marcadores gliales en células A530.....	71
Figura 23: Perfil genómico de los genes supresores <i>Nf1</i> y <i>Trp53</i> en células A530.....	71
Figura 24: Variación temporal de proteínas reloj en células A530.....	72
Figura 25: Cuantificación de los niveles de expresión de las proteínas reloj en células A530	73
Figura 26: Variación temporal del estado redox en células A530.	73
Figura 27: Susceptibilidad de células A530 al tratamiento con Bortezomib.	74
Figura 28: Caracterización de la población de células A530 A5.	75
Figura 29: Crecimiento tumoral en ratones inyectados con células A530.	76

Figura 30: Crecimiento tumoral en ratones inyectados con células A530 sincronizadas en distintos horarios.....	76
Figura 31: Crecimiento tumoral de células A530 inyectadas en ratones C57BL/6 mantenidos en OO77	
Figura 32: Crecimiento tumoral de células A530 control y A530 A5 en ratones C57BL/6.....	78
Figura 33: Seguimiento del volumen tumoral de células B16 inyectadas en ratones mantenidos en ciclos regulares de LO.	79
Figura 34: Crecimiento tumoral en ratones inyectados con células B16.	80
Figura 35: Crecimiento de tumores provenientes de células A530 tratados con BOR.....	80
Figura 36: Esquema representativo de los resultados obtenidos en relación a la regulación del crecimiento tumoral por el reloj circadiano.....	85

Índice de ilustraciones y tablas

Ilustración 1: Función temporal periódica y sus parámetros característicos.	5
Ilustración 2: Esquema simplificado del sistema circadiano.....	7
Ilustración 3: Organización jerárquica del sistema circadiano.....	9
Ilustración 4: Maquinaria del reloj molecular en mamíferos.....	11
Ilustración 5: Relación entre la ritmicidad circadiana y el metabolismo.....	14
Ilustración 6: Ciclos transcripcionales, citosólicos y metabólicos.	14
Ilustración 7: Evolución de los componentes del reloj.....	16
Ilustración 8: Sistema de PRX-2Cys.	16
Ilustración 9: Esquema de la biosíntesis <i>de novo</i> y remodelado de GFLs en mamíferos.	21
Ilustración 10: Protocolo de sincronización de las células T98G.	32
Ilustración 11: Esquema representativo del protocolo de sincronización y tratamiento de células T98G con el quimioterapéutico BOR.....	38
Ilustración 12: Esquema representativo del protocolo de sincronización y tratamiento de células T98G con el compuesto SR9009.	40
Ilustración 13: Esquema representativo del protocolo para evaluar la progresión del ciclo celular en células T98G tratadas con SR9009.	40
Ilustración 14: Determinación de la velocidad de crecimiento tumoral.	43
Tabla 1: Fenotipos de actividad locomotriz asociado a mutaciones de genes involucrados en el mecanismo del reloj molecular.....	13
Tabla 2: Mutaciones en genes reloj y defectos metabólicos o relacionados a cáncer	26
Tabla 3: Protocolo de ciclado de PCR	34
Tabla 4: Secuencias de <i>primers</i> y tamaño del producto amplificado por PCR.....	34
Tabla 5: Anticuerpos utilizados en Western Blot.....	35
Tabla 6: Anticuerpos utilizados en Inmunocitoquímica	36

Tabla 7: Secuencias de sgRNA clonadas en el plásmido PX459..... **39**

Tabla 8: Reactivos utilizados para la amplificación de ADN genómico **42**

Tabla 9: Secuencia de *primers* de los genes *Nf1* y *Trp53* y patrón de bandas **42**