

## “Relojes y Ritmos Biológicos y su impacto en nuestras vidas”

Mario E. Guido<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>CIQUIBIC-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, 5000

Córdoba, Argentina.

<sup>2</sup>Departamento de Química Biológica “Ranwel Caputto”, Facultad de Ciencias Químicas,

Universidad Nacional de Córdoba, 5000 Córdoba, Argentina.

\* Información de Contacto: Dr. Mario E. Guido, CIQUIBIC (CONICET) - Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Haya de la Torre s/n, Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina Te: 54-351-5353855 Ext. 3429/30, E-mail: mguido@fcq.unc.edu.ar

### RESUMEN

Los organismos vivos tienen la capacidad de medir el tiempo internamente dado que cuentan con un sistema de temporización denominado sistema circadiano que les ha permitido adaptarse a los cambios ambientales (alternancia día/noche, luz/oscuridad) que ocurren a lo largo del día. Para esto se dispone de un **reloj biológico** endógeno que regula diversas funciones bioquímicas, fisiológicas y conductuales con un periodo cercano a las 24 h. El sistema circadiano está conformado por relojes centrales (ubicados en el cerebro) y periféricos distribuidos en distintos órganos y tejidos; más aún, hoy se conoce que osciladores también están presentes en células individuales. Dicho sistema circadiano está sustentado genéticamente, concretamente el mecanismo molecular del reloj biológico comprende ciclos de expresión de genes codificantes para proteínas “reloj” que se prenden y apagan a lo largo de las 24 h, descubrimiento realizado por Hall, Young y Rosbash en drosófila y que les valió el Premio Nobel de Medicina 2017. Es de destacar que este mecanismo está presente en mamíferos también. Sin embargo, un oscilador metabólico ha surgido con mayor anterioridad y está presente en todos los dominios de vida (arquea, procariota, eucariota). A nuestro entender, el reloj celular está conformado por el reloj molecular de transcripción y traducción y el oscilador metabólico. La luz constituye la señal externa más potente para sincronizar el reloj central ubicado en el cerebro a través de un circuito no-visual que va de la retina a distintas áreas nerviosas. Sin embargo, otras señales externas también pueden ser fuertes sincronizantes como la alimentación, la temperatura, la actividad física, entre otras. Con el advenimiento de la modernidad: la luz artificial, los turnos rotativos (nocturnos) en el trabajo, y vuelos trans-meridianos, el ciclo diario de actividad/descanso se ha visto seriamente afectado provocando la desincronización de los procesos fisiológicos endógenos. La disrupción de los ritmos diarios está asociada, entre otros aspectos, a enfermedades metabólicas, a desórdenes en el sueño, depresiones estacionales, etc., como así también a una mayor predisposición a ciertos tipos de cáncer. En la presente disertación se discutirá sobre el funcionamiento del reloj biológico en células tumorales y la implicancia del sistema circadiano en el crecimiento tumoral y la

susceptibilidad diferencial de las células cancerosas al tratamiento con agentes quimioterapéuticos en distintos horarios.

## INTRODUCCION

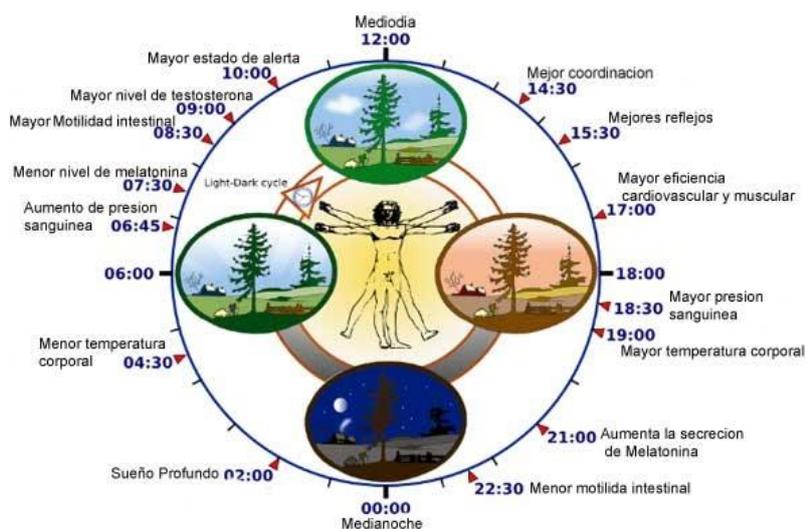
La vida en la Tierra se originó y evolucionó en un ambiente cíclico como consecuencia de la rotación de nuestro planeta sobre su eje y alrededor del sol; esto ocasiona la alternancia día/noche a lo largo de las 24 horas, y con esto, los ciclos de luz/oscuridad, como así también las estaciones y los marcados cambios en la duración del día y la noche, en la cantidad e intensidad de luz, y en la temperatura a lo largo del día/noche y las estaciones.

La mayoría de los seres vivos hemos desarrollado mecanismos endógenos que nos permiten medir el tiempo biológico, en respuesta y adaptación al medio ambiente cambiante que nos rodea. Estas maquinarias denominadas **relojes biológicos** se encuentran evolutivamente conservadas y constituyen herramientas fundamentales responsables de coordinar procesos fisiológicos y metabólicos que pueden cambiar a lo largo del día en un dado organismo. El estudio de estos relojes endógenos alcanza relevancia debido a que regulan nuestras vidas controlando temporalmente y de modo preciso una gran variedad de procesos fisiológicos, metabólicos y conductuales, que se sincronizan con las condiciones ambientales externas. Como puede observarse en el siguiente esquema todos estos procesos ocurren en el momento óptimo para el correcto funcionamiento del organismo, al igual que ocurre en una orquesta en donde todos los actores deben ejecutar una partitura en forma armónica y sincronizada.

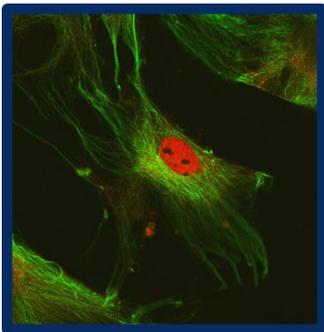
El advenimiento de la modernidad y la industrialización (luz artificial, dietas hipercalóricas, vuelos transmeridianos, trabajo nocturno en turnos rotativos) ha provocado la pérdida de sincronía entre los procesos internos de nuestro organismo

y el ambiente que nos rodea, lo que se denomina **disrupción circadiana**. Esta situación conlleva a una mayor incidencia en enfermedades metabólicas (obesidad e hipertensión, diabetes tipo II, síndrome metabólico) y un mayor riesgo de cáncer (Lahti, Merikanto, and Partonen 2012). En relación a tales evidencias, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) incluyó en 2007 el trabajo de turnos rotativos como un posible factor carcinogénico de tipo 2 similar a la intoxicación con plomo.

Durante muchos años hemos conocido que los organismos vivos, incluyendo los humanos, contamos con un **reloj biológico interno** que nos permite medir el tiempo. Este reloj biológico le permite a los organismos vivos anticiparse, y por lo tanto adaptarse mejor, a los cambios diarios cíclicos que ocurren en el medio ambiente que nos rodea. Pero, ¿cómo funciona realmente este reloj? Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash y Michael W. Young, tres investigadores norteamericanos, líderes en el campo de la **cronobiología** (la ciencia que estudia los procesos biológicos en relación



al tiempo), galardonados recientemente con el **Premio Nobel en Fisiología y Medicina 2017**, fueron los primeros en describir a nivel molecular, un mecanismo de relojería por el cual funcionan estos relojes biológicos. Sus descubrimientos les permitieron proponer el primer modelo de reloj biológico sobre el cual después se pudo explicar cómo las plantas, los animales y los seres humanos adaptan sus ritmos biológicos internos para que estén sincronizados con la rotación de la Tierra y los ciclos día/noche. Utilizando las moscas de la fruta como organismo modelo, estos investigadores aislaron primero un gen que denominaron **Periodo** (tiempo total en el que transcurre una oscilación completa) que controla los ritmos diarios de la fisiología (hormonas, temperatura, etc.) y el comportamiento de un organismo. Ellos mostraron que este gen codifica una proteína que se acumula en la célula durante la noche, y luego se degrada durante el día. Posteriormente, identificaron otras proteínas adicionales de esta maquinaria, elucidando un proceso que gobierna el mecanismo molecular de relojería autosostenido que tiene lugar dentro de la célula. Sabemos hoy que los relojes biológicos funcionan bajo **los mismos principios** en células de otros organismos multicelulares, incluyendo humanos. Básicamente consiste en un conjunto de genes que se regulan mutuamente a través de **mecanismos de retroalimentación negativa** interconectados (unos activan la expresión de ciertos genes y otros la inhiben cerrando el círculo en 24 h), la identidad de los genes cambia cuando se comparan bacterias, hongos, plantas y animales; pero el mecanismo es el mismo. Con exquisita precisión, nuestro reloj interno adapta nuestra fisiología a las fases dramáticamente diferentes del ciclo día/noche.



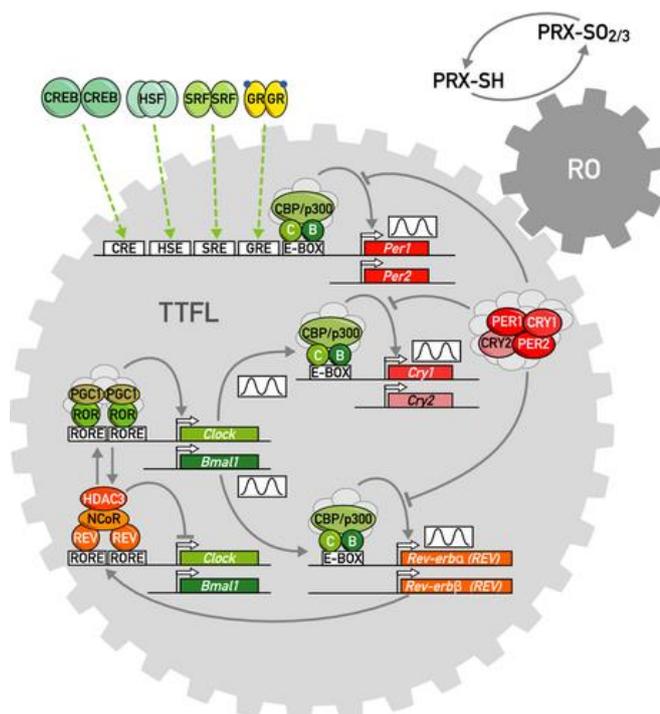
**Microfotografía de inmunofluorescencia mediante microscopía confocal de fibroblasto de ratón teñido en verde para tubulina denotando el citoesqueleto celular, y la proteína PER del reloj molecular en rojo, demarcando el núcleo.** Adaptado de tesis doctoral de Sebastian Marquez (2004) (Para más información ver Marquez et al FASEB J 2004)

La luz y la temperatura son factores ambientales fundamentales para la vida. El reloj regula las funciones críticas, tales como el comportamiento (cuando comemos, dormimos o estamos activos), los niveles hormonales, el sueño, la temperatura corporal y el metabolismo; incluso cuando podemos aprender y memorizar mejor. Nuestro bienestar se ve afectado cuando hay un desajuste temporal entre nuestro entorno externo y este reloj biológico interno, por ejemplo cuando viajamos a través de varios husos horarios y experimentamos "*jet lag*", o también cuando experimentamos situaciones donde hay desajuste crónico entre nuestro estilo de vida asociado a la vida moderna (iluminación artificial prolongada, dietas hipercalóricas, trabajos nocturnos, etc.) y el ritmo dictado por nuestro reloj interno; desajuste que se asocia a un mayor riesgo o predisposición a varias enfermedades o desordenes metabólicos, como así también algunos tipos de cánceres.

El descubrimiento del mecanismo molecular mediante el cual los genes denominados "reloj" controlan las oscilaciones circadianas (del latín *circa*: cercano, *diano*: día) en células, y a partir de ellas en órganos y tejidos, ha llevado a un nuevo paradigma en nuestra comprensión de cómo los organismos anticipan y se adaptan al ambiente rítmico en el que vivimos y tiene importantes implicancias para la salud.

En mamíferos, el **reloj circadiano** es autónomo y está conformado a nivel molecular por ciclos de transcripción y traducción de retroalimentación negativa (Lowrey and Takahashi 2004; Joseph S Takahashi et al. 2008). El ciclo principal involucra los genes reloj *Clock*, *Bmal1*, *Periodo* (*Per1*, *Per2*) y Criptocromo (*Cry1*, *Cry2*), los cuales se diferencian en elementos regulatorios

positivos de activación transcripcional (*Clock*, *Bmal1*, NPAS2) y otros elementos negativos de represión transcripcional (*Pers* y *Crys*). Durante el día, los factores de transcripción CLOCK/NPAS2 que contienen dominios bHLH (basic helix-loop-helix)-PAS interactúan con BMAL1 para activar la transcripción de los genes *Per* y *Cry*, 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 (Lee et al. 2001). Durante la noche, el complejo represor PER-CRY es degradado, y CLOCK: BMAL1 puede luego activar un nuevo ciclo de transcripción. El ciclo entero tarda aproximadamente 24 horas en completarse; sin embargo, se conoce poco acerca de la estequiometría y cinética de este mecanismo regulatorio.



**Esquema 1. Maquinaria del reloj molecular en mamíferos.** El circuito está compuesto por dos “ciclos” interconectados de regulación negativa en la expresión génica. Los factores de transcripción de regulación positiva CLOCK y BMAL1 se unen a motivos E-BOX del DNA y reclutan a proteínas co-activadoras CBP/p300 y otros polipéptidos, dando lugar a la activación de genes del primer ciclo de regulación, como *Per1/2* y *Cry1/2*, y del segundo, como *Rev-erba/β*. A su vez, cuando las proteínas PER1/2 y CRY1/2 se acumulan en el citoplasma, se unen en un complejo represor que atenúa el potencial trans-activador de CLOCK y BMAL1. Como consecuencia, los niveles del complejo represor compuesto por PER y CRY disminuyen y por lo tanto también su actividad represora sobre la acción de CLOCK y BMAL1, dando lugar a la iniciación de un nuevo ciclo de ~24hs en la producción de los represores PER y CRY. En un ciclo secundario, CLOCK y BMAL1 activan mientras que PER/CRY reprimen la transcripción de genes que codifican los receptores nucleares REV-ERBA/β (REV). Cuando sus niveles de expresión son altos, se unen a sitios RORE presentes en regiones promotoras y enhancers de los genes *Clock* y *Bmal1*, y

reprimen su transcripción. En contraparte, cuando los niveles de REV son bajos, otro receptor nuclear, ROR, se une al sitio RORE y activa la transcripción de *Clock* y *Bmal1*. Por otro lado, *Per1/2* actúan en la sincronización del reloj molecular, al ser estimulados por factores de transcripción de respuesta temprana cuya actividad es controlada por hormonas, segundos mensajeros, temperatura o neurotransmisores. Algunos de dichos factores de transcripción son: elementos de respuesta a AMPc y unión a proteína-CRE (CREB), unión de HSF1 a elementos de respuesta a shock térmico (HSEs), factores de respuesta al suero (SRF) unidos a elementos de respuesta al suero (SREs) y receptores de glucocorticoide (GR) unidos a elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs). **A nivel celular**, se ha descrito **un reloj redox/metabólico (RO)** que interactúa con el reloj molecular transcripcional, regulando ciclos de oxidación de peroxirredoxinas (PRX). Modificado de Dibner and Schibler 2015.

Asimismo, es de destacar que a nivel celular, se ha descrito **un reloj redox/metabólico (RO)** que interactúa con el reloj molecular transcripcional pero que puede funcionar aun en ausencia de transcripción como ocurre en células enucleadas (glóbulos rojos) regulando ciclos de oxidación de peroxirredoxinas (PRX) (Dibner and Schibler 2015). Este reloj redox/metabólico es totalmente ancestral y evolutivamente conservado, observándose desde bacterias al hombre. Hoy sabemos que el **reloj celular** que controla temporalmente el funcionamiento de los procesos celulares está conformado por el reloj molecular (transcripción/traducción) y el oscilador metabólico/redox.

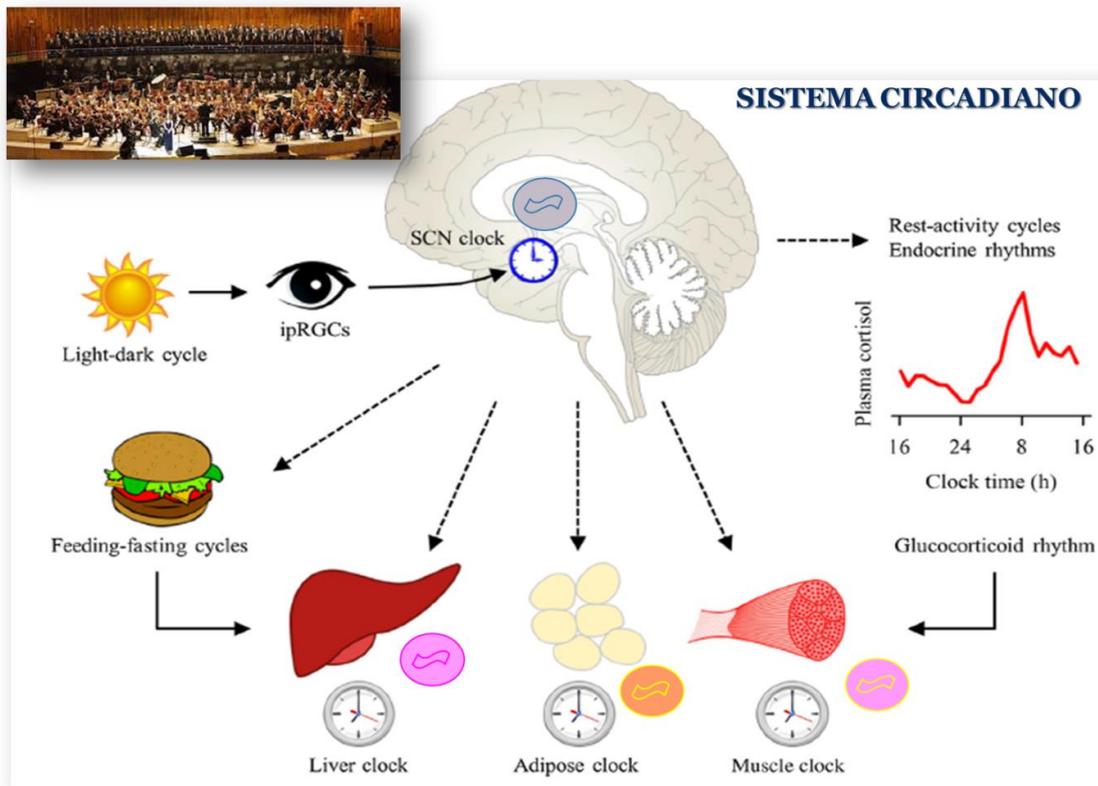
Si bien se ha establecido una estrecha relación entre los relojes circadianos y el metabolismo celular (Bass and Takahashi 2010), poco se conoce acerca del funcionamiento de los mismos en la regulación del metabolismo de células cancerígenas.

Asimismo, dentro del metabolismo en general, los glicerofosfolípidos (GFL) en particular, han sido objeto de estudio en nuestro laboratorio. Los GFLs constituyen un grupo fundamental de lípidos con funciones importantes como componentes estructurales de todas las membranas biológicas y elementos clave involucrados en la señalización celular, el equilibrio y reserva energética, el transporte vesicular, la división celular, la apoptosis y la comunicación entre células. Es de destacar que el metabolismo de GFLs experimenta una gran regulación por el reloj biológico (Guido et al 2001; Guido et al 2010, Marquez et al 2004, Acosta et al 2013, Gorne et al 2015 y otros). Aunque el reloj circadiano influye en el proceso de división celular a través de circuitos regulatorios complejos, la desregulación de la expresión génica del reloj central y la pérdida de la homeostasis circadiana pueden promover el desarrollo del cáncer. En la actualidad, se sabe poco sobre la regulación temporal de la biosíntesis de GFL en células tumorales inmortalizadas. El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral más agresivo y las células T98G humanas constituyen un modelo de GBM de utilidad para evaluar el funcionamiento del reloj biológico y el tratamiento con diferentes agentes quimioterapéuticos.

Por lo tanto, en esta segunda parte de la disertación, abordaremos si las células T98G de glioblastoma humano sujetas a proliferación en presencia de suero o arresto (en un medio sin suero) retienen un reloj funcional capaz de regular la expresión génica a nivel molecular y el metabolismo redox y GFL bajo una base circadiana.

### **Puesta en hora del reloj biológico**

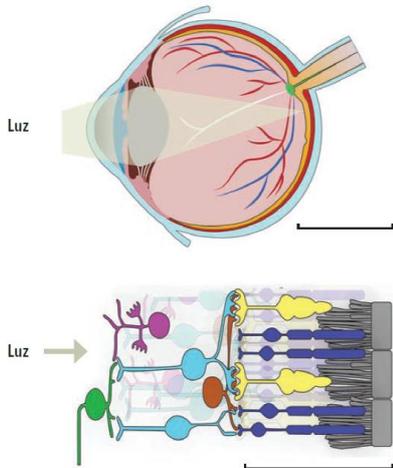
En los vertebrados, el **sistema circadiano** (la orquesta) organiza temporalmente la fisiología del organismo, generando ritmos bioquímicos y conductuales (ciclos de sueño-vigilia, cambios en la temperatura corporal, cambios en la síntesis y liberación de hormonas, etc.) (Revisión en Golombek y Rosenstein, 2010; Guido et al., 2010; Guido 2013) y como se mencionó previamente, está conformado por numerosos osciladores/relojitos ubicados en los distintos órganos, tejidos y dentro de las células mismas. El director de orquesta, el reloj maestro, reside en el hipotálamo, en 2 núcleos pequeños denominados **Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ)**. Todos estos relojes son capaces de medir el tiempo en el rango circadiano (cerca a las 24 h), pero no son exactos de 24 h, pueden ser de menos o más de 24 h. Por ejemplo, en los humanos los ritmos diarios son de 24 h y 11 min mientras que en los pollos son de 23 h y 40 min. Es por esto que hace falta ponerlos en hora diariamente con las señales externas del medio ambiente (la luz, la alimentación, la temperatura, la interacción social, etc.) para evitar desfases y que funcionen exactamente con 24 h. Este proceso de ajuste diario del reloj se denomina "**sincronización**". La luz (proveniente de la alternancia día/noche y los ciclos de luz/oscuridad ambiental), constituye el principal y más potente sincronizador del sistema circadiano dado que los cambios en la intensidad lumínica varían ~ 6-10 órdenes de magnitud a lo largo del día, como puede experimentarse fácilmente comparando la intensidad lumínica (luminancia) entre el mediodía de un día soleado y la oscuridad de una noche cerrada.



**Esquema 2 El Sistema Circadiano.** El **sistema circadiano** (la orquesta) organiza temporalmente la fisiología del organismo, generando ritmos bioquímicos y conductuales (ciclos de sueño-vigilia, cambios en la temperatura corporal, cambios en la síntesis y liberación de hormonas, etc.) Dicho sistema, está conformado por numerosos osciladores/relojitos ubicados en los distintos órganos, tejidos y dentro de las células mismas. El director de orquesta, el reloj maestro, reside en el hipotálamo, en 2 núcleos pequeños denominados **Núcleos Supraquiasmáticos (SCN)** que se ponen en hora a través de las señales de la luz (ciclos luz/oscuridad) que llegan de las CGRif (ipRGCs) de la retina, de señales hormonales (ritmo de glucocorticoide) o la alimentación (ciclos de alimentación/ayuno). Se destaca también el reloj ubicado en el hígado (liver), tejido adiposo (adipose) y muscular (muscle clock). **Modificado de Gooley JJ, Chua EC (2014).**

La **retina** ubicada en la parte posterior del ojo de todos los vertebrados, incluyendo a los mamíferos y a nosotros los humanos (**Ver Esquema 2**), juega un rol esencial en el funcionamiento de dicho sistema ya que es la encargada de registrar las condiciones ambientales de iluminación, detectando la luz, y ajustar así el reloj interno al fotoperíodo del mundo exterior a través de un circuito no-visual que conecta directamente la retina con los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos a través del tracto retino-hipotalámico (Guido et al., 2010; Diaz et al. 2015; Guido 2016; ). Efectivamente, estos núcleos del hipotálamo reciben un gran caudal de proyecciones que vienen de la retina y esto es clave porque la retina, además de su función fundamental en la visión, es la encargada de detectar las condiciones ambientales de iluminación tal como ocurre a lo largo del día-noche y enviar esta información lumínica al cerebro, a los mencionados núcleos para ponerlos en hora con el medio externo. Este circuito involucra las células ganglionares retinales (CGRs) y varias áreas del cerebro, y regula procesos tales como el reflejo pupilar, la sincronización por luz de los ritmos de actividad y alimentación, el sueño y la inhibición de la producción de melatonina en la glándula pineal (marcador nocturno). La retina, dado que también contiene un reloj endógeno, presenta la capacidad de medir el tiempo y generar oscilaciones bioquímicas y de

expresión génica autosostenidas con periodicidad ~24 h que le permite predecir y anticiparse en su fisiología a los cambios ambientales en la iluminación (día/noche) (revisión en Guido et al., 2010).



**Esquema 2 Ojo (panel superior) /Retina (panel inferior):** El esquema superior representa un corte vertical del ojo humano: muestra la retina (anaranjado), el epitelio pigmentario (rojo) y el nervio óptico (verde). El óvalo representa el cristalino o lente, al que llega la luz luego de atravesar la córnea (a la izquierda). La barra que da la escala mide 10 milímetros. El croquis inferior es un corte transversal enormemente ampliado de un fragmento de la retina: los rectángulos grises a la derecha indican el epitelio pigmentario, que envuelve la cara exterior de la retina; las células fotorreceptoras son los conos (amarillo) y los bastones (violeta), hacia adentro de los cuales están las células horizontales (marrón), amacrinas (fucsia) y bipolares (celeste), y en la cara interior de la retina se encuentran las células ganglionares (verde) cuyos axones forman el nervio óptico que se conecta con el cerebro. La barra que da la escala mide 10 micrómetros (es decir, 10 milésimas de milímetro). Tomado de Guido ME, Ciencia Hoy 2016

## Circuito Visual y No visual



**Esquema 3 Circuito Visual y No Visual.** Modificado de *Provencio I* (2011) y adaptación complementaria, mostrando el circuito visual (celeste) que proyecta a la corteza visual y el circuito no visual (naranja) que proyecta a otras áreas del cerebro, y sus funciones relacionadas a la formación de imágenes (visión de colores o nocturna) o de no formación de imágenes, controlando la puesta en hora del reloj biológico, el reflejo pupilar, estado de ánimo etc. Adaptado de Luis Morera, tesis doctoral (2016)

En paralelo con la visión y formación de imágenes en sí, los seres vivos hemos desarrollado un 2do conjunto de células fotorreceptoras en la retina, las células ganglionares retinales intrínsecamente fotosensibles (CGRif) que trabajan en forma complementaria con las células visuales,

primordialmente para detectar luz independientemente de la visión. Estas CGRif son responsables de ajustar el reloj biológico a las condiciones ambientales, regular la entrada de luz a través de la pupila (el reflejo pupilar) e indicarle a la glándula pineal que es de día a fin de inhibir la producción de la hormona melatonina. Este mecanismo ancestral es evolutivamente conservado y se mantiene activo aun en situaciones de ceguera, cuando las células fotorreceptoras visuales se encuentran dañadas (Esquemas 3 Y 4)



**Esquema 4 Fotorreceptores No Visuales:** Las células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensible (CGRif) y otras células de la retina interna involucradas en el circuito no visual (no asociado a la formación de imágenes) que persiste aun en animales ciegos, y que regula la constricción pupilar, la puesta en hora del reloj biológico (sincronización de los ritmos circadianos de alimentación en pollos), el sueño y otras actividades. Se citan trabajos del grupo con aporte original en la temática. Adaptado de Daniela Verra, tesis doctoral (2014)

### Cáncer, Relojes y Metabolismo Celular.

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 celular y la división. Entre las características típicas de los procesos neoplásicos se encuentran la activación de una proliferación sostenida, la evasión de supresores del crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la inmortalidad replicativa, la inducción de angiogénesis, y la capacidad de invasión y metástasis. A esto se le suma la inestabilidad genética que conlleva a la diversidad génica que facilita los procesos inflamatorios, la reprogramación del metabolismo energético y la evasión del sistema inmune (Hanahan and Weinberg 2010).

En cuanto a los tumores del sistema nervioso en particular, los gliomas de alto grado son los tumores cerebrales primarios más frecuentes, extremadamente agresivos e invasivos. En éstos, existe una notable heterogeneidad inter-tumoral a nivel molecular y celular. Esta heterogeneidad 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. Ha

quedado claro que existe una considerable heterogeneidad inter-tumoral a nivel molecular y celular y que ésta muchas veces se traduce en distintas respuestas clínicas a tratamientos determinados (Martini, Vecchione et al. 2012).

Los glioblastomas multiformes son tumores del sistema nervioso central que se caracterizan por ser altamente proliferativos e infiltrantes. Luego del diagnóstico, la supervivencia del paciente es de aproximadamente 12-14 meses siguiendo el protocolo terapéutico denominado Stupp. Esta estrategia consta de la remoción quirúrgica (*de ser posible*) de la masa tumoral seguido de radioterapia y quimioterapia con Temozolamida. Sin embargo, debido a la capacidad infiltrante de este tumor, generalmente la eliminación total no se puede asegurar. Entender la biología de los tumores y entre ellos los de cerebro como es el caso de glioblastomas, sirve de base para el diseño racional de nuevos abordajes terapéuticos (Stupp R, et al. 2005; We PY, 2008)

Sin embargo, poco se conoce en estos y otros tipos de tumores, respecto de las posibles oscilaciones metabólicas/redox que pudieran ocurrir a lo largo de los procesos de crecimiento y proliferación celular. En este contexto, el conocimiento a nivel molecular y metabólico de la biología circadiana puede contribuir significativamente al entendimiento y potencial tratamiento de las patologías humanas, y en particular del cáncer (Lahti, Merikanto et al. 2012). Además, estudios transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos recientes, desarrollados en tejidos de mamíferos, han demostrado una sólida interrelación entre el reloj circadiano y el metabolismo celular en general y la homeostasis y el metabolismo de lípidos en particular (Asher and Schibler 2011; Eckel-Mahan, Patel et al. 2012). Se conoce hoy, como ya se mencionó, que un reloj redox (RO)/metabólico que impulsa los ciclos de oxidación de las peroxirredoxinas celulares que regulan los niveles endógenos de peróxidos, funciona incluso en ausencia de transcripción como ocurre por ejemplo en células enucleadas como los glóbulos rojos, y se encuentra altamente conservado a través de la evolución, y presente en todos los reinos de la vida de bacterias al hombre (O'Neill, van Ooijen et al. 2011; Edgar, Green et al. 2012).

Considerando la persistencia evolutiva del sistema circadiano que controla temporalmente la fisiología y conducta de la mayoría de los seres vivos, y que, en principio, las células tumorales también contienen un reloj intrínseco, surgen las siguientes preguntas:

**¿Se mantiene funcional el oscilador metabólico que pueda ayudar a controlar los ritmos de células tumorales incluso cuando el reloj molecular se encuentre alterado en condiciones proliferativas?**

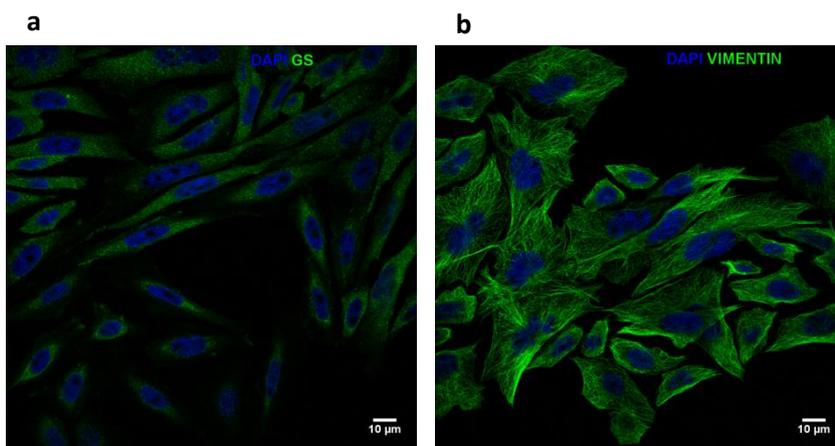
Y una vez establecidas estas oscilaciones: ¿Existe alguna correlación entre las oscilaciones metabólicas, el reloj molecular y la respuesta de las células a drogas quimioterapéuticas? ¿Se podrá inferir a partir de la observación del estado metabólico/circadiano tumoral, momentos del día en donde las células sean más susceptibles al tratamiento?

Con el propósito de responder estos interrogantes, en esta parte de la disertación nos concentraremos en discutir los resultados recientes de nuestro grupo.

## **Estudios con células T98G en cultivo derivadas de glioblastoma multiforme humano**

### **1a. Caracterización de las células T98G en cultivo**

Las células T98G provenientes de un glioblastoma multiforme de hombre de 61 años exhiben características típicas de células cancerosas con un ciclo celular de 24-28 h de duración aproximada 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 Fig. 1.



### **Fig. 1: Marcadores gliales en células T98G en cultivo derivadas de glioblastoma humano.**

Las células T98G expresan marcadores típicos de origen glial como la Glutamina sintasa (a, verde) y Vimentina (b, verde) visualizadas por inmunofluorescencia con anticuerpos primarios específicos y núcleos celulares (azul). Adaptado de Wagner P, tesis doctoral 2019.

Estas células de origen glial expresan marcadores específicos tales como glutamina sintasa (GS) y vimentina. A fin de realizar estudios circadianos y dado que cada célula individual puede contener un reloj propio, los cultivos se sincronizaron con una señal de glucocorticoide, mediante un pulso breve de Dexametasona (DEX, 100 nM), y luego los cultivos se cosecharon a distintos horarios a lo largo de 24-48 h. Es de destacar que las células provenían de 2 condiciones experimentales distintas a saber: 1) arresto: cuando fueron crecidas sin suero y 2) proliferativa: cuando fueron crecidas en presencia de suero.

### **Caracterización de las células T98G E1**

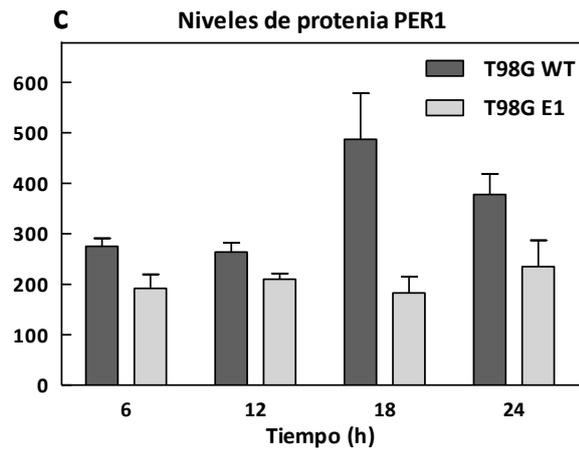
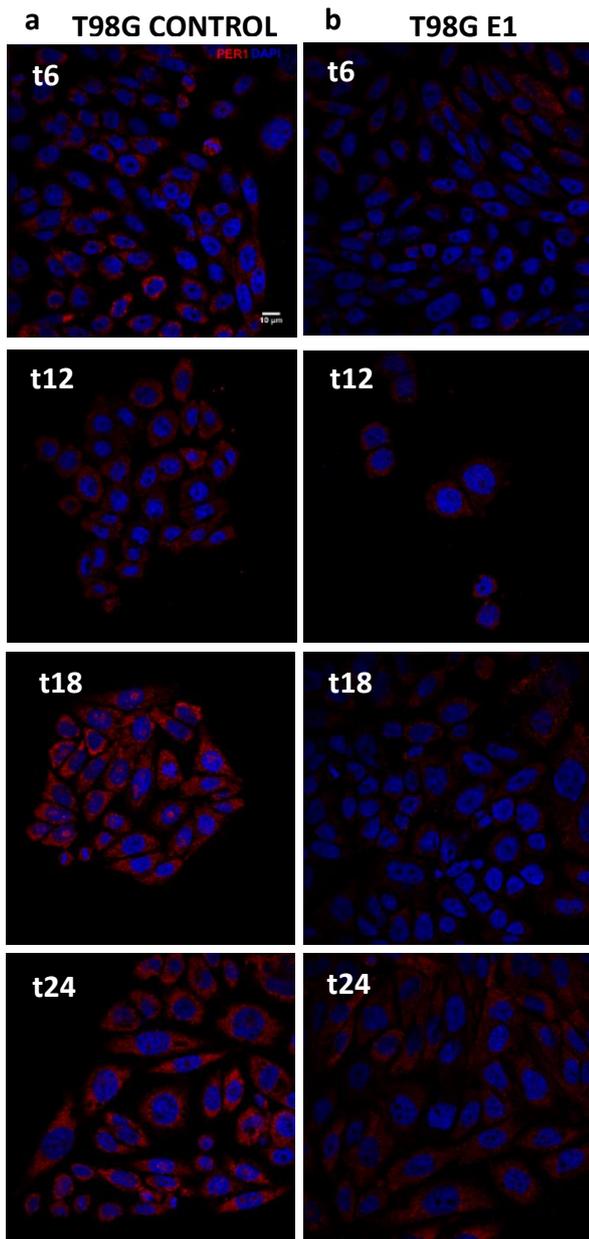
Con el objetivo de evaluar si existe algún vínculo entre el reloj molecular y el reloj metabólico/redox, se planteó alterar la expresión del gen reloj *Bmal1* en células T98G. Para ello, se utilizó la tecnología de edición CRISPR/Cas9 y posterior selección de las células transfectadas con antibiótico (Ran, F. A., P. D. Hsu, et al. 2013). Se evaluaron a continuación distintos parámetros evidenciando la disminución en la expresión de *Bmal1* en el pool de células transfectadas denominado T98G E1. Se evaluó la expresión del ARNm de *bmal1* y de su gen target *per1* mediante RT-PCR. De estos ensayos, se evidenció la disminución tanto del ARNm de *Bmal1* como de *Per1* (Wagner et al Mol Neurobiol 2019).

Posteriormente, se evaluaron los niveles de la proteína PER1 mediante inmunocitoquímica en muestras recolectadas de células T98G WT (control) y T98G E1 post- sincronización con DEX. Los resultados sugieren una oscilación significativa en los niveles de la proteína PER1 en células T98G WT ( $p < 0.005$  ANOVA) con mayores niveles a las 18 y 24 h post- sincronización. Por el contrario, las células T98G transfectadas con el plásmido PX459-*Bmal1* (*knockdown* de *Bmal1*) mostraron niveles reducidos de la proteína PER1 y no se evidenciaron diferencias temporales significativas en la abundancia de la misma a lo largo de las 24 h examinadas (Fig. 2).

En conjunto, estos resultados demuestran que el pool de células T98G E1 presentan 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.

### **Reloj metabólico en células T98G**

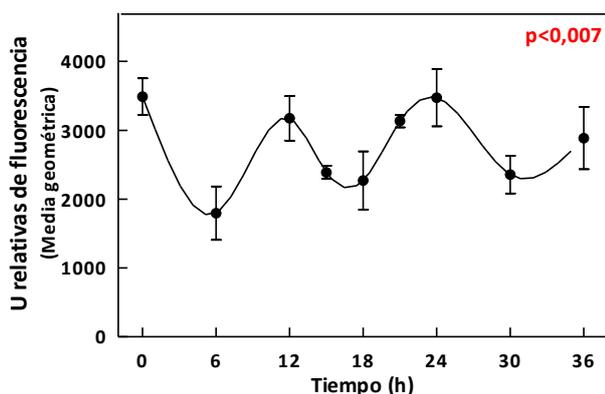
Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron la existencia de variaciones temporales tanto en la expresión de ARNm de genes reloj (*Per1*, *Rev-erb*) y genes controlados por el reloj (*Pcyt-2*, *Cka*) como en la marcación metabólica de glicerofosfolípidos (GPLs) con  $^{32}\text{P}$ -fosfato en células T98G sincronizadas y mantenidas en arresto parcial o proliferación. Los resultados evidenciaron variaciones temporales significativas en la expresión de ARNm de los genes estudiados en la condición de arresto parcial, mientras que en proliferación, tales oscilaciones se perdían. En cambio, los resultados para la marcación metabólica de  $^{32}\text{P}$ -GPLs evidenciaron oscilaciones circadianas en ambas condiciones de cultivo (Wagner et al. 2019). Por tal motivo nos planteamos estudiar si podría existir un reloj metabólico activo que ayude a controlar los ritmos en células T98G en proliferación aun cuando el reloj molecular se encuentre alterado.



**Fig. 2: Variación temporal de PER1**

Los niveles de PER1 fueron analizados a lo largo de 24 h mediante ICQ en células T98G WT (a) y T98G E1 (b) sincronizadas y mantenidas en proliferación. c) Histogramas indicando los niveles relativos de la proteína PER1 en células T98G WT (negro) y T98G E1 (gris) a diferentes tiempos post-sincronización. El análisis estadístico revela un efecto significativo del tiempo en la abundancia de PER1 en células T98G ( $p < 0.005$  ANOVA). Cuando las células son transfectadas con el plásmido PX459-*Bmal1*, disminuyen los niveles de PER1 y desaparece la variación temporal evidenciada en las células T98G WT. *Adaptado de Wagner et al Mol Neurobiol 2019.*

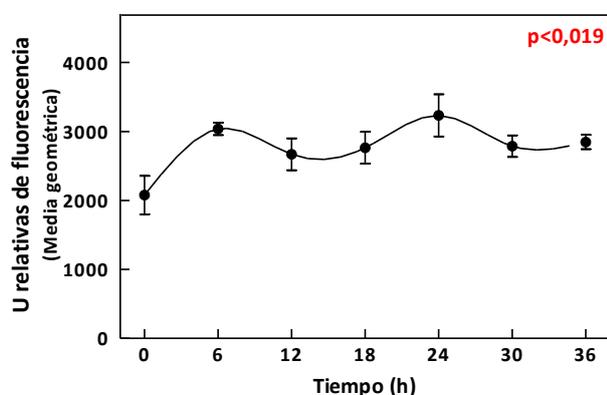
Para ello, se evaluó el estado redox en células T98G sincronizadas y mantenidas en proliferación. Luego de la sincronización, las células fueron cosechadas a intervalos de 6 h durante 36 h e incubadas con la sonda 2'-7'-Diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFH-DA) (2  $\mu$ M) durante 40 minutos 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, H<sub>2</sub>DCF. Esta molécula no fluorescente se acumula intracelularmente y luego de la oxidación, produce altas cantidades del producto fluorescente 2'-7'-dicloro-fluoresceína (DCF), proporcional a la actividad de las esterasas intracelulares. De esta manera, el estado redox de la muestra puede ser monitoreado mediante citometría de flujo midiendo la emisión de fluorescencia a 530 nm cuando la muestra es excitada a 484nm (Eruslanov and Kusmartsev 2010). La intensidad de fluorescencia analizada reveló una variación temporal significativa en el estado redox ( $p < 0.01$  Kruskal-Wallis) con un periodo de 12 h ( $p < 0.008$  Cosinor) (Fig. 3).



**Fig. 3: Variación temporal del estado redox en células T98G WT**

Luego de la sincronización, las células fueron cosechadas cada 6 h durante 36 h. El estado redox medido utilizando la sonda (DCFH-DA) reveló una oscilación temporal significativa con un periodo de 12 h. *Adaptado de Wagner et al Mol. Neurobiol. 2019.*

Luego de corroborar que el estado redox en las células T98G en proliferación muestra variaciones temporales significativas con un periodo de 12 h, nos focalizamos en estudiar si el reloj molecular podría estar vinculado con 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 poseen menor 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 ( $p < 0.02$  Cosinor) (Fig. 4), evidenciándose un vínculo importante entre el reloj molecular y el estado redox de la célula.



**Fig. 4: Variación temporal del estado redox en la población T98G E1 con su reloj molecular dañado.**

Luego de la sincronización, las células fueron cosechadas cada 6 h durante 36 h. El estado redox medido utilizando la sonda DCFH-DA, reveló una oscilación temporal significativa con un periodo de 18 h ( $p < 0.02$  Cosinor). *Adaptado de Wagner et al Mol Neurobiol 2019.*

### **Susceptibilidad al quimioterapéutico Bortezomib**

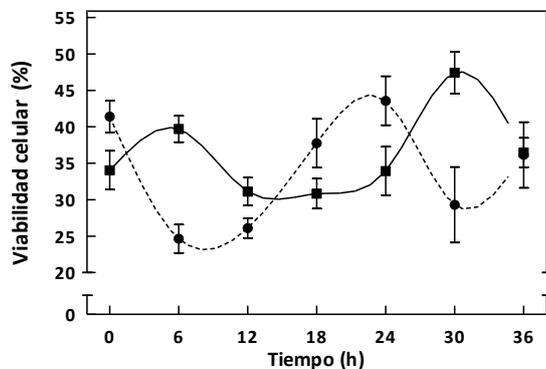
Luego de evidenciar oscilaciones temporales en distintos procesos metabólicos (GFLs, estado redox, etc.) en células T98G sincronizadas y mantenidas en proliferación, nos focalizamos

en evaluar si existen estadios diferenciales en las células tumorales en los cuales las mismas resulten más susceptibles a la quimioterapia. En este caso, evaluamos la susceptibilidad al quimioterapéutico bortezomib (BOR), un potente inhibidor del proteosoma (Vlachostergios, P. J., E. Hatzidaki, et al. 2013).

Para tal fin, las células T98G sincronizadas y mantenidas en proliferación fueron tratadas con BOR (500nM) a cada uno de los tiempos post- sincronización durante 36 h. Considerando un 100% de viabilidad en aquellas células incubadas sólo 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 que va desde las 12 a las 24 h (Fig. 5). El análisis estadístico claramente muestra un efecto significativo del tiempo, tratamiento e interacción ( $p < 0.0001$  by ANOVA) 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 por COSINOR (función coseno) reveló que la oscilación observada presentó un periodo de 30 h ( $p < 0.01$ ).

Posteriormente, se diseñaron una serie de experimentos para estudiar 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 se vieron alteradas en las células T98G E1 que presentan su reloj molecular alterado ( $p < 0.0013$  Kruskal-Wallis), la oscilación exhibió un marcado adelanto de fase de 6 h con los menores niveles de viabilidad celular entre las 6 y 12 h luego de la sincronización (Fig. 5).

Cabe destacar que en los tiempos post- sincronización en los cuales las células control poseen mayor estado redox ( $t_0$ ,  $t_{12}$ ,  $t_{24}$ ) (Figs. 3 y 5), se observó menor viabilidad celular luego del tratamiento con la droga BOR, evidenciando de esta manera un posible vínculo entre el estado redox de la célula al momento en el cual se realiza el tratamiento con el quimioterapéutico y la susceptibilidad al mismo.



**Fig. 5: Respuesta diferencial de células T98G al tratamiento con BOR**

Las células T98G WT (línea continua) o 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 E1 en relación a las células T98G WT. *Adaptado de Wagner et al Mol Neurobiol 2019.*

Resultados similares se observaron con otro agente citostático que afecta directamente el reloj molecular como es el compuesto SR9009, que es un agonista del factor represor REV-ERB, involucrado en un ciclo alternativo del reloj molecular (Ver Esquema 1) (Wagner, Monjes, Guido ASN Neuro 2019).

En base a los resultados obtenidos en esta última parte de la disertación discutiremos sobre el impacto de los relojes biológicos en las células tumorales.

El desequilibrio entre el sistema circadiano interno -que regula temporalmente la fisiología y el comportamiento de los humanos- y el ambiente que nos rodea, debido a las condiciones de vida moderna (iluminación artificial que prolonga la jornada de trabajo o estudio, los turnos rotativos de trabajo, y los viajes transmeridianos, etc.), resulta en un aumento significativo en el riesgo de padecer enfermedades crónicas. Esta disrupción del reloj biológico endógeno con el medio

ambiente externo conduce a efectos directos sobre distintos aspectos de la salud humana, incluyendo hipertensión, diabetes, enfermedades cardíacas, obesidad y mayor riesgo de cáncer.

### **¿Funciona el reloj biológico en células tumorales?**

Considerando antecedentes y estudios previos de nuestro laboratorio, nos planteamos investigar en general si el reloj biológico funciona o no en células tumorales, y de ser así, evaluar si hay horarios del día en que estas células cambian en su metabolismo, siendo más susceptibles a la quimioterapia. Específicamente, hemos investigado como es la regulación temporal del metabolismo celular en un modelo tumoral, utilizando células T98G de glioblastoma humano, como así también en células de gliomas de ratón A530 capaces de formar tumores una vez inyectadas en la zona del nervio ciático de ratones (trabajo en preparación). El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor de cerebro más agresivo y que presenta peor pronóstico luego de su diagnóstico, y las células T98G humanas constituyen un modelo útil para investigar el reloj circadiano en un modelo tumoral. Para este fin, en primer lugar, optimizamos un protocolo para obtener células T98G quiescentes y en proliferación capaces de ser sincronizadas por una señal extracelular, shock de DEX, lo cual fue demostrado anteriormente que fortalece la función del reloj en células B16 (Kiessling et al. 2017). Por otra parte, la DEX es utilizada comúnmente en pacientes que sufren GBM a fin de reducir la neuroinflamación o como adyuvante en la quimioterapia. Con los protocolos aplicados *in vitro*, logramos investigar la función del reloj celular tanto del reloj circadiano molecular como del reloj metabólico/redox (Edgar, Green et al. 2012; Takahashi 2015; Brown 2016) (Ray and Reddy 2016) en un intento de simular dos condiciones de crecimiento presentes en las células tumorales con mayor o menor tasa de división (proliferación o arresto parcial) y agresividad, respectivamente.

En relación al reloj metabólico, en los últimos años se ha evidenciado que los ciclos de oxidación/ reducción de las proteínas peroxirredoxinas (PRX) constituyen un marcador universal de ritmos circadianos desde humanos a moscas, hongos, bacteria y *Archaea*. Estas observaciones probablemente reflejan un control temporal en respuesta a cambios oxidativos ambientales promoviendo una oscilación endógena en la generación de especies reactivas de oxígeno "ROS". Este mecanismo, ampliamente conservado a través de la evolución, podría conferir la habilidad de sobrevivir a ciclos de estrés oxidativos (O'Neill, van Ooijen et al. 2011; Edgar, Green et al. 2012). Las proteínas PRX con actividad peroxidasa están principalmente involucradas en la remoción de ROS. En este sentido nuestros resultados evidenciaron ciclos significativos en el estado redox (niveles de ROS) como también en la abundancia de las peroxirredoxinas oxidadas/hiperoxidadas (Wagner, Sosa Alderete et al. 2019), principalmente sugiriendo una ritmicidad bimodal con un periodo de 12 h para los niveles de ROS. Tales observaciones coinciden con una publicación reciente apoyando la idea de la existencia de un reloj de 12 horas en mamíferos distinto al reloj circadiano que coordinaría los ritmos metabólicos y de estrés celular (Zhu, Zhang et al. 2017).

Además, las oscilaciones de PRX persisten aún en ausencia de los ciclos transcripcionales requeridos para coordinar el reloj circadiano molecular (Edgar et al. 2012; O'Neill et al. 2011). En este sentido, nuestras observaciones claramente demuestran que aun cuando la ritmicidad de la expresión de genes reloj y genes controlados por el reloj se encuentra alterada en células T98G, el oscilador metabólico continua operando y es responsable de coordinar distintas vías del metabolismo de glicerofosfolípidos, estado redox y ciclos de PRX (Wagner, Sosa Alderete et al. 2019).

### **¿Se puede utilizar el conocimiento del reloj biológico de las células tumorales para implementar una cronoterapia más eficiente?**

Esta capacidad oscilatoria abre una ventana temporal terapéutica donde las células tumorales presentan mayor susceptibilidad y pueden ser selectivamente tratadas usando el quimioterapéutico BOR, como fue mostrado en la Fig. 5. En tales experimentos, los mayores niveles de susceptibilidad al BOR (70%) fueron alcanzados en una ventana de tiempo que va desde las 12 hasta las 24 h luego de la sincronización por DEX comparados con sólo ~ 50% de muerte celular a otros tiempos evaluados.

En resumen, nuestras observaciones nos permiten establecer un grado importante de correlación entre el estado de la célula y el balance redox: células en proliferación experimentan la

mayor susceptibilidad al agente quimioterapéutico en una ventana temporal cercana a las 12 h en la cual el estado redox de la célula es alto. Utilizando el inhibidor de proteosoma BOR, distintos trabajos evidenciaron que el mismo promueve la generación de ROS en mitocondria en distintos tipos de cáncer y en última instancia, desencadena la muerte celular (Vriend and Reiter 2015); estas observaciones apoyan nuestros resultados mostrando que la mayor susceptibilidad al tratamiento con BOR fue encontrada cuando se alcanza el pico en los niveles de ROS.

Distintos trabajos sugieren un fuerte *cross-talk* entre el reloj molecular y el oscilador metabólico como fue observado en los ciclos de las PRX en mutantes para los genes reloj que evidenciaron una fase circadiana alterada comparado con el *wild-type* (Edgar, Green et al. 2012). En relación a tales evidencias, investigamos la posible interacción entre ambos osciladores en células tumorales, evaluando la alteración del reloj transcripcional mediante la disminución en la expresión de *Bmal1*. En efecto, las células transfectadas con el plásmido PX459-*Bmal1* (*knockdown* de *Bmal1*) presentan menor expresión del ARNm y niveles de proteínas del gen reloj target *Per1* y muestran ausencia en la variación temporal de *Per1* respecto a las células controles (Fig. 2). Además, bajo esta condición, la amplitud de los ciclos redox de 12 h fue sustancialmente disminuida y el periodo de la fluctuación se extendió a 18 h (Fig. 4) mientras que la respuesta al tratamiento con BOR exhibió un marcado avance o adelanto de fase de 6 h (Fig. 5).

En relación al control temporal del crecimiento tumoral *in vivo*, estudios pioneros se están llevando a cabo en nuestro laboratorio en donde se investigan las diferencias temporales en la velocidad de crecimiento de tumores provenientes de células A530 de origen glial inyectadas en distintos horarios en el nervio ciático de ratones C57BL/6 mantenidos en ciclos de 12:12 L/O.

## CONCLUSIONES FINALES

Nuestros resultados revelaron que las células T98G provenientes de un glioblastoma multiforme humano mantenidas en cultivo contienen un reloj celular intrínseco que regula distintas funciones metabólicas. Las células de glioblastoma fueron capaces de ser sincronizadas mediante un shock de DEX evidenciando oscilaciones significativas en el estado redox y distintos parámetros metabólicos. Esta capacidad provee una oportunidad para mejorar el tratamiento quimioterapéutico a tiempos precisos luego de la sincronización y, por lo tanto, aumentar la susceptibilidad al tratamiento con un agente quimioterapéutico por encima de la media del 50%. Esta observación es de gran relevancia ya que en los últimos años pocos avances se han alcanzado en lograr una mayor eficacia en la terapéutica de este tipo de tumores. Recientemente hemos observado que además del BOR, el agonista de REV-ERB del reloj molecular, SR9009, tiene también efectos diferenciales en el tiempo y su combinación con BOR a dosis bajas, presenta marcados efectos sinérgicos (Wagner et al ASN Neuro 2019).

Considerando que una disrupción del reloj molecular puede alterar los ritmos redox y la respuesta diferencial en la susceptibilidad al tratamiento quimioterapéutico en células en cultivo, y además que una disminución en la expresión de *Bmal1* promueve el crecimiento de células tumorales *in vivo*, podríamos inferir un fuerte *cross-talk* entre el reloj transcripcional y el oscilador metabólico a fin de favorecer el crecimiento tumoral y la sobrevida en el tiempo. Independientemente de la naturaleza precisa de esta conexión entre ellos, el oscilador transcripcional y metabólico trabajan en conjunto para mantener la homeostasis celular.

**Estos estudios ofrecen por primera vez una mirada distinta sobre el crecimiento tumoral y su posible tratamiento quimioterapéutico, agregando un concepto “cronoterapéutico” que permitiría realizar un tratamiento más efectivo en horarios particulares a fin de matar las células cancerígenas en mayor medida, con la potencialidad de menores efectos colaterales indeseados.**

## BIBLIOGRAFIA (trabajos del laboratorio en negrita)

**Acosta-Rodriguez V., Marquez S., G. Salvador, S. Pasquare, L Gorne, E. Garbarino-Pico, N.M. Giusto, M.E. Guido. (2013) Daily rhythms of glycerophospholipid synthesis in fibroblast cultures involve differential enzyme**

- contributions". *The Journal of Lipid Research*, 54(7):1798-811,. Print ISSN 0022-2275, doi: 10.1194/jlr.M034264.**
- Asher, G. and U. Schibler (2011). "Crosstalk between Components of Circadian and Metabolic Cycles in Mammals." *Cell Metabolism* 13(2): 125-137.
- Balsalobre, A., F. Damiola, et al. (1998). "A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells." *Cell* 93(6): 929-937.
- Bass, J. and J. S. Takahashi (2010). "Circadian integration of metabolism and energetics." *Science (New York, N.Y.)* 330(6009): 1349-1354.
- Brown, S. A. (2016). "Circadian Metabolism: From Mechanisms to Metabolomics and Medicine." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 27(6): 415-426.
- Contin MA, Verra, D.M., Guido ME., "An invertebrate-like phototransduction cascade mediates light detection in the chicken retinal ganglion cells". *The FASEB J*, 2006. 20(14):2648-50.**
- Contin MA, Verra DM, Salvador G, Ilincheta M, Giusto NM, Guido ME. , "Light-activation of the Phosphoinositide Cycle in Intrinsically Photosensitive Chicken Retinal Ganglion Cells". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010. 51 (11): p 5491-5558.**
- Díaz N. M., Morera L. P., Verra D. M., Contin M. A., Guido M.E., "Early appearance of non-visual and circadian markers in the developing inner retinal cells of chicken" *BioMed Research International*, 2014, 1-9, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/646847>**
- Díaz N. M.; Morera L. P. and Guido M.E. "Melanopsin and the Non-visual Photochemistry in the Inner Retina of Vertebrates", *Photochemistry and Photobiology*, 2015, Jan; 92(1):29-44. doi: 10.1111/php.12545. Online ISSN: 1751-1097.**
- Díaz N. M.; Morera L. P., Tempesti T. and Guido M.E.. "The Visual Cycle in the Inner Retina of Chicken and the involvement of Retinal G-Protein-coupled Receptor (RGR)". *Molecular Neurobiology* 2016, 1-11, march 17. doi:10.1007/s12035-016-9830-5. SSN: 0893-7648 (Print) 1559-1182 (Online)**
- Dibner, C. and U. Schibler (2015). "Circadian timing of metabolism in animal models and humans." *Journal of Internal Medicine* 277(5): 513-527.
- Eckel-Mahan, K. L., V. R. Patel, et al. (2012). "Coordination of the transcriptome and metabolome by the circadian clock." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(14): 5541-5546.
- Edgar, R. S., E. W. Green, et al. (2012). "Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms." *Nature* 485(7399): 459-464.
- Eruslanov, E. and S. Kusmartsev (2010). Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*. D. Armstrong. Totowa, NJ, Humana Press: 57-72.
- Golombek DA, Rosenstein RE (2010). *Physiology of circadian entrainment*. *Physiol Rev*. 2010 Jul;90(3):1063-102. doi: 10.1152/physrev.00009.2009. Review.
- Gooley JJ, Chua EC. (2014) *Diurnal regulation of lipid metabolism and applications of circadian lipidomics*. *J Genet Genomics*. May 20;41(5):231-50. doi: 10.1016/j.jgg.2014.04.001. Epub 2014 Apr 21. Review.
- Gorne L, Acosta-Rodriguez V., Salvador G., Pasquare S., Giusto N.M., Guido M.E. (2015).The mouse liver displays daily rhythms in the metabolism of Phospholipids", *Chronobiol Int. Feb*;32(1):11-26. doi: 10.3109/07420528.2014.949734. Epub 2014 Aug 20.**
- Guido, M.E., Garbarino E, Contin MA, Valdez D, Nieto P, Verra D, Acosta V, de Zabalia N, Rosenstein RE. "Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: novel players in the circadian system". *Prog Neurobiol*, 2010. 92(4): p. 484-504.**
- Hanahan, D. and Robert A. Weinberg "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." *Cell* 144(5): 646-674.
- Jiang, W., S. Zhao, 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 Letters* 371(2): 314-325.
- Lahti, T., I. Merikanto, et al. (2012). "Circadian clock disruptions and the risk of cancer." *Annals of Medicine* 44(8): 847-853.
- Liu, Y., J. Ludes-Meyers, et al. (2002). "Inhibition of AP-1 transcription factor causes blockade of multiple signal transduction pathways and inhibits breast cancer growth." *Oncogene* 21(50): 7680.
- Marquez, S., P. Crespo, et al. (2004). "The metabolism of phospholipids oscillates rhythmically in cultures of fibroblasts and is regulated by the clock protein PERIOD 1." *The FASEB Journal* 18(3): 519-521.**
- Martini, M., L. Vecchione, et al. (2012). "Targeted therapies: how personal should we go?" *Nat Rev Clin Oncol* 9(2): 87-97.
- Morera, L. P., N. M. Díaz, et al. (2016). "Horizontal cells expressing melanopsin x are novel photoreceptors in the avian inner retina." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(46): 13215-13220.**

- O'Neill, J. S., G. van Ooijen, et al. (2011). "Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote." *Nature* **469**(7331): 554-558.
- Ran, F. A., P. D. Hsu, et al. (2013). "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system." *Nature protocols* **8**(11): 2281-2308.
- Ray, S. and A. B. Reddy (2016). "Cross-talk between circadian clocks, sleep-wake cycles, and metabolic networks: Dispelling the darkness." *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **38**(4): 394-405.
- Rios, M.N., Marchese N.A. and Guido ME. "Expression of non-visual opsins *Opn3* and *Opn5* in the cdeveloping inner retinal cells of birds. Light-responses in Muller glial cells" *Front. Cellular Neurosci.*, 2019, doi: 10.3389/fncel.2019.00376
- Nieto P.S., Valdez D.J., Acosta-Rodriguez V.A. and Guido M. E. "Expression of novel opsins and intrinsic light responses in the mammalian retinal ganglion cell line RGC-5. Presence of *Opn5* in the rat retina". *PLoS One*, 2011, 6(10):e26417. ISSN 1932-6203
- Takahashi, J. S. (2015). "Molecular components of the circadian clock in mammals." *Diabetes, obesity & metabolism* **17 Suppl 1**(0 1): 6-11.
- Valdez D. J, Nieto P. S., Garbarino-Pico E., Avalle L. B., Díaz-Fajreldines H., Schruer C., Cheng K., and Guido M. E., "A Non-Mammalian Vertebrate Model of Blindness Reveals Functional Photoreceptors in the Inner Retina". *The FASEB J*, 2009, 23 (4), 1186-1195.
- Valdez D., Nieto P., Diaz N., Garbarino-Pico E. and Guido M. E. "Differential Regulation of Feeding Rhythms through a Multiple-Photoreceptor System in an Avian Model of Blindness". *The FASEB Journal*, 2013, 27(7):2702-12.
- Valdez D.J., Garbarino-Pico E., Díaz N.M., Silvestre D. and Guido M. E.. "Differential Regulation of Arylalkylamine N-Acetyltransferase Activity in Chicken Retinal Ganglion Cells by Light and the Circadian Clock". *Chronobiology International*, 2012, Oct;29(8):1011-20. ISSN: 0742-0528 (print), 1525-6073 (electronic)
- Verra, D. M., Contin, M. A., Hicks, D., and Guido, M. E. (2011) Early onset and differential temporospatial expression of melanopsin isoforms in the developing chicken retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 5111-5120.
- Vlachostergios, P. J., E. Hatzidaki, et al. (2013). "Bortezomib Downregulates MGMT Expression in T98G Glioblastoma Cells." *Cellular and Molecular Neurobiology* **33**(3): 313-318.
- Vriend, J. and R. J. Reiter (2015). "The Keap1-Nrf2-antioxidant response element pathway: A review of its regulation by melatonin and the proteasome." *Molecular and Cellular Endocrinology* **401**: 213-220.
- Wagner, P. M., L. G. Sosa Alderete, et al. (2019). "Proliferative Glioblastoma Cancer Cells Exhibit Persisting Temporal Control of Metabolism and Display Differential Temporal Drug Susceptibility in Chemotherapy." *Molecular Neurobiology* **56**(2): 1276-1292.
- Wagner PM, Monjes NM and Guido ME. (2019) "The chemotherapeutic effect of SR9009, a REV-ERB agonist, on the human glioblastoma T98G cells" *ASN Neuro* 2019 Jan-Dec;11:1-14. doi: 10.1177/1759091419892713.
- Zhu, B., Q. Zhang, et al. (2017). "A Cell-Autonomous Mammalian 12 hr Clock Coordinates Metabolic and Stress Rhythms." *Cell metabolism* **25**(6): 1305-1319.e1309.

## Artículos de divulgación

- Guido Mario E. (2013) "De Relojes y Ritmos Biológicos", , revista electrónica FCQ UNC Bitácora Digital, ISSN 2344-9144, 1 (2) 1-6, agosto 2013.
- Guido Mario E. (2016), "Percibir luz proporciona más que visión a los animales", Ciencia Hoy, sept.-octubre 2016, 26. 151, 43-46. ISSN 1666-5171
- PROVENCIO I (2011) 'Hidden organ in our eyes found to control circadian rhythms and emotions' *Scientific American*, 304, 54-59.
- Curso sobre "Relojes y Ritmos Biológicos". Plataforma Virtual EdX de la UNC. Director Dr. Guido, y colaboradores. Sitio web: <https://www.edx.org/course/relojes-y-ritmos-biologicos>