



Trebucq, Laura Lucia

Rol del reloj circadiano en la progresión, fisiología y respuesta a quimioterapias del glioblastoma



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.

Atribución - No Comercial 2.5

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Trebucq, L. L. (2023). *Rol del reloj circadiano en la progresión, fisiología y respuesta a quimioterapias del glioblastoma. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/4567>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Rol del reloj circadiano en la progresión, fisiología y respuesta a quimioterapias del glioblastoma

TESIS DOCTORAL

Laura Lucia Trebucq

laura.trebucq@gmail.com

Resumen

Los ritmos circadianos consisten en oscilaciones de variables fisiológicas con un período cercano a 24 horas, y los mismos se encuentran presentes en la mayoría de los seres vivos. Estos ritmos son generados por un reloj circadiano endógeno que, en mamíferos, se localiza en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo. El reloj circadiano controla la ritmicidad de una multiplicidad de variables metabólicas y fisiológicas de los organismos.

Los glioblastomas (GBM) son el tipo de tumor cerebral primario más común y agresivo. Ya han sido descritas en los últimos años diversas interacciones entre el reloj circadiano y la progresión del cáncer (incluyendo la progresión del GBM) observándose que el reloj molecular posee un rol importante en la proliferación, migración, invasión, en la interacción con el microambiente tumoral y en la respuesta a quimioterapias, en diversos tipos tumorales. La presente tesis se propuso estudiar in vitro e in vivo el rol del reloj circadiano en la progresión, proliferación y respuesta a quimioterapias, analizando el efecto que la alteración genética del reloj circadiano celular del GBM, y la disrupción ambiental del reloj circadiano central del hospedador, poseen en diversos aspectos de la fisiología tumoral. Las drogas quimioterapéuticas estudiadas fueron la temozolomida, que es la actual droga de elección para el tratamiento de GBM, y la droga 1A-116, una droga novedosa desarrollada en la UNQ.

Bajo la hipótesis que tanto el reloj circadiano de las células tumorales como el del organismo portador regulan la progresión tumoral, la interacción tumor-microambiente y la respuesta a quimioterapias, la presente tesis tuvo como objetivo analizar y describir dicha regulación en un modelo de GBM. Por tanto, en primera instancia, en el Capítulo I se describirá cómo se llevó a cabo un modelo de deficiencia genética en el reloj circadiano tumoral de las células LN229 (un modelo de GBM humano) y el impacto sobre la proliferación y progresión tumoral, tanto in vitro como in vivo, utilizando ratones nude como modelo murino xenogénico de GBM.

A su vez, se analizará el impacto que poseen esquemas de alteración circadiana por exposición a luz constante del ratón nude hospedador sobre la progresión del GBM.

En el Capítulo II, se analizará cómo la disrupción circadiana generada por exposición a condiciones de luz constante, y la ausencia de un reloj circadiano tumoral, impactan en la interacción del GBM con su microambiente, tanto in vitro como in vivo.

El Capítulo III se centrará en el estudio tanto in vitro como in vivo de la respuesta del glioblastoma a quimioterapias, utilizando la quimioterapia actual con la droga temozolomida, así como con la droga novedosa 1A-116, administrando las mismas en esquemas cronofarmacológicos (es decir, buscando el momento del día donde la efectividad de una droga es máxima y su toxicidad es mínima).

Los resultados obtenidos en la presente tesis profundizan la comprensión del papel que juega el reloj circadiano, tanto a nivel celular en el tumor, como central en el hospedador, en la progresión y fisiología del GBM; y a su vez, en la interacción con su microambiente tumoral, particularmente los astrocitos, algo que no había sido descrito hasta el momento. Por otro lado, la presente tesis describe la cronofarmacología de una droga novedosa para el tratamiento del GBM, 1A-116, comparándola con la droga actualmente utilizada, la temozolomida. Estos resultados tienen un potencial terapéutico fundamental para desarrollar más y mejores estrategias tendientes a prolongar y mejorar la esperanza y calidad de vida de los pacientes con GBM.

Índice

Abreviaturas utilizadas	4
Introducción general	9
1. Los ritmos circadianos en mamíferos	11
1.1. ¿Qué es el tiempo?	11
1.2. Los ritmos biológicos.....	13
1.3. Una pequeña historia de los ritmos biológicos	13
1.4. De sistemas circadianos y relojes biológicos.....	16
1.5. Parámetros y estudio de los ritmos circadianos	19
1.6 El sistema circadiano: el reloj central	26
1.7. Componentes moleculares del reloj circadiano	30
1.8. El sistema circadiano: el mecanismo de sincronización	34
1.9. El sistema circadiano: los osciladores periféricos.....	38
2. Los Gliomas	41
2.1. Breve descripción de la neuroglia	41
2.2. Cuando el equilibrio se rompe.....	44
2.3. Clasificación histopatológica de los gliomas.....	46
2.4. Clasificación molecular de los glioblastomas.....	50
2.5. Tratamiento de los glioblastomas.....	53
3. Interacción entre los ritmos circadianos y el cáncer	57
3.1. La desincronización circadiana como factor de riesgo de cáncer	57
3.2. El reloj molecular en las células tumorales.....	59
3.3. El reloj molecular y el ciclo celular.....	61
Hipótesis y objetivo general	65
Materiales y métodos generales	69
1.1. Cultivo celular	71
1.1.1. Línea celular LN229.....	71
1.1.2. Líneas celulares LN229-Per2luc y LN229-Bmal1luc	72
1.1.3. Condiciones de cultivo celular	73
1.1.4 Sincronización circadiana de cultivos celulares	73
1.2. Registros bioluminiscentes <i>in vitro</i>	74
1.2.1 Plásmido pGL3-Bmal1-dLuc.....	74
1.2.2. Transfección de células con pGL3-Bmal1-dLuc.....	75
1.2.3. Registro de ritmos de bioluminiscencia.....	75

1.3. Extracción de ARNm y síntesis de ADNc	76
1.4. PCR en tiempo real.....	76
1.5. In-cell westerns	77
1.6. Animales	77
1.6.1. Condiciones de mantenimiento.....	77
1.6.2. Implantación intracraneal (i.c) de células LN229 y LN229E1	79
1.6.3. Perfusiones.....	80
1.6.4. Procesamiento de los cerebros para tinción	81
1.6.5. Tinción de Nissl	81
1.6.6. Inmunohistoquímicas.....	82
1.7. Análisis de los resultados.....	82
Bibliografía General	85
Capítulo I.....	101
Rol del reloj circadiano en la proliferación y pronosis del glioblastoma	101
1.Introducción.....	103
1.1. Modelos de arritmicidad celular para el estudio de la interacción entre los ritmos circadianos y el cáncer.....	103
1.2. La luz constante como modelo de disrupción circadiana para estudiar la progresión del cáncer.	106
2. Hipótesis y objetivos	109
3. Materiales y metodología.....	111
3.1. Generación de la línea celular LN229 deficiente de <i>bmal1</i>	111
3.1.1. Plásmido StBL3E1.....	111
3.1.2. Selección por puromicina.....	112
3.1.3. Transfección de LN229 con StBL3E1	112
3.1.4. Evaluación de la edición génica.....	113
3.2. Expresión de ARNm de Bmal1	113
3.3 <i>In-cell westerns</i> de BMAL1 y PER1.....	114
3.4. Proliferación de las líneas celulares LN229 y LN229E1	114
3.5. Registros de bioluminiscencia <i>in vivo</i>	114
3.6. Progresión de glioblastomas de genotipos <i>wild type</i> (LN229) y <i>knock down</i> para <i>bmal1</i> (LN229E1) en ratones <i>nude</i>	115
3.6.1. Análisis de la sobrevida y volumen tumoral	115
3.6.2. Ritmos de temperatura	116
3.6.3. Evaluaciones exploratorias y motoras (test de cilindro)	116

3.7. Progresión de glioblastomas <i>wild type</i> (LN229) bajo condiciones normales de LO o de disrupción circadiana del reloj central por luz constante (LL) en ratones <i>nude</i>	117
3.7.1. Análisis de sobrevida y tamaño tumoral.....	117
3.8. Análisis de resultados	117
3.8.1. Adquisición y procesamiento de imágenes	117
3.8.2. Análisis estadístico	118
4.Resultados	120
4.1 Rol del reloj circadiano tumoral en la progresión del GBM	120
4.1.1 Construcción de un modelo genético deficiente en <i>bmal1</i>	120
4.1.2. Evaluación de la progresión del GBM frente a la ausencia de un reloj circadiano tumoral	132
4.2 Impacto de la disrupción circadiana inducida mediante luz constante en la progresión del GBM	141
5. Discusión.....	145
6. Resumen del Capítulo	155
Bibliografía del Capítulo I.....	157
Capítulo II.....	167
Interacción entre el reloj circadiano y el microambiente tumoral del glioblastoma	167
1. Introducción.....	169
1.1. El microambiente tumoral del glioblastoma	169
1.2. El microambiente del GBM y el reloj circadiano	174
1.3. Modelos de estudio del microambiente del GBM	175
2. Hipótesis y Objetivos	179
3. Materiales y metodología.....	181
3.1. Cultivo celular	181
3.1.1. Cultivos primarios de astrocitos	181
3.2. Experimentos con medios condicionados	182
3.2.1. Preparación del DMEM con SFB	182
3.2.2. Evaluación de la proliferación de astrocitos y células tumorales (LN229 y LN229E1) frente a la adición de medios condicionados.....	183
3.2.3. Evaluación de la expresión de CD44 en LN229 y LN229E1 frente a la adición de medios condicionados de astrocitos (co-cultivos indirectos).	187
3.3. Optimización de los marcadores a ser utilizados en los experimentos <i>in vivo</i>	188
3.4. Inmunohistoquímica	188
3.5. Análisis de resultados	189
3.5.1 Adquisición y procesamiento de imágenes	189
3.5.2. Análisis estadístico.	190

4. Resultados	191
4.1. Caracterización de los cultivos primarios de astrocitos.....	191
4.2. Experimentos con medios condicionados	191
4.2.1. Evaluación de la proliferación de astrocitos y células tumorales (LN229 y LN229E1) frente a la adición de medios condicionados.....	191
4.2.2. Evaluación de la expresión de CD44 en LN229 y LN229E1 frente a la adición de medios condicionados de astrocitos	196
4.3. Puesta a punto de los marcadores a ser utilizados en los experimentos <i>in vivo</i> ...	198
4.4. Evaluación de la expresión de CD44 en GBM y de la reactividad de astrocitos en ratones <i>nude</i> implantados con células LN229 y LN229E1.	199
4.5. Evaluación de la expresión de CD44 en GBM y la reactividad de astrocitos en ratones <i>nude</i> expuestos a condiciones de luz constante.....	204
5. Discusión.....	209
6. Resumen del Capítulo	217
Bibliografía del Capítulo II.....	219
Capítulo III.....	229
Estudio cronofarmacológico de Temozolomida y la droga novedosa 1A-116 para el tratamiento del glioblastoma	229
1. Introducción.....	231
1.1. Cronofarmacología.....	231
1.2. TMZ y la droga 1A-116.....	235
2. Hipótesis y objetivos	243
3. Materiales y metodología.....	245
3.1. Experimentos con 1A-116 y sus blancos.....	245
3.1.1. Expresión de ARNm de Tiam1 y Rac1.....	245
3.1.2. In-cell western de TIAM1	246
3.1.3. Preparación de solución stock de 1A-116.....	246
3.1.4. Determinación de la concentración inhibitoria cincuenta (IC50) de 1A-116 sobre la proliferación de LN229.....	246
3.1.5. Evaluación de posibles efectos sincronizadores de la droga 1A-116 sobre las células LN229 mediante registros de bioluminiscencia	247
3.1.6. Modulación cronofarmacológica del efecto de 1A-116 sobre la proliferación de LN229 y LN229E1	247
3.1.7. Ensayo cronofarmacológico del efecto tóxico de 1A-116 sobre LN229.....	248
3.1.8. Ensayo cronofarmacológico del efecto de 1A-116 sobre la migración de LN229.	249
3.1.9. Ensayo cronofarmacológico del efecto de 1A-116 sobre la apoptosis temprana de LN229.....	250

3.2. Experimentos con Temozolomida	250
3.2.1. Modulación cronofarmacológica del efecto de TMZ sobre la proliferación de las células LN229.....	250
3.3. Experimentos con 1A-116	251
3.3.1. Sobrevida de ratones <i>nude</i> frente a la administración de 1A-116 en dos horarios	251
3.4. Experimentos con TMZ	251
3.4.1. Sobrevida de ratones <i>nude</i> frente a la administración de TMZ en dos horarios	251
3.4.2. Registros de bioluminiscencia <i>in vivo</i> del crecimiento tumoral.	252
3.4.3. Inmunohistoquímica.....	253
3.5. Análisis de resultados	253
3.5.1. Adquisición y procesamiento de imágenes	253
3.5.2. Análisis estadístico.	254
4. Resultados	254
4.1. Cronofarmacología de la droga 1A-116.....	254
4.1.1. Tiam1 presenta una oscilación circadiana a nivel de ARNm y proteína en LN229.....	254
4.1.2. 1A-116 presenta un ritmo de efectividad en las células LN229, pero no en las LN229E1	257
4.1.3. La toxicidad de 1A-116 sobre las células LN229 depende del horario de administración	262
4.1.4. La inhibición de la migración de las células LN229 frente al tratamiento con 1A-116 depende del horario de administración	264
4.1.5. La inducción de apoptosis en las células LN229 frente al tratamiento con 1A-116 depende del horario de administración	266
4.1.6. La efectividad de 1A-116 es cronomodulada <i>in vivo</i>	268
4.2. Cronofarmacología de la droga TMZ.....	270
4.2.1. TMZ presenta un ritmo de efectividad en las células LN229.....	270
4.2.2. TMZ no presenta una efectividad dependiente del momento de administración <i>in vivo</i>	272
5. Discusión.....	275
6. Resumen del Capítulo	283
Bibliografía del Capítulo III.....	285
Discusión y conclusiones generales	295
ANEXO.	303
Proliferación y prognosis del GBM en ratones macho y hembra.	303
1. Introducción.....	305

2. Materiales y métodos.....	307
2.1. Análisis de sobrevida	307
2.2. Evaluación del tamaño tumoral y de la proliferación.....	307
2.3. Análisis de los resultados.....	307
2.3.1. Adquisición y procesamiento de imágenes	307
2.3.2. Análisis estadístico.	308
3. Resultados	309
3.1. Análisis de sobrevida	309
3.2. Análisis del tamaño tumoral y de la proliferación.....	309
4. Discusión.....	313
Bibliografía del Anexo.....	315
Consideraciones	317
 finales	317
Agradecimientos.....	323



Rol del reloj circadiano en la progresión, fisiología y respuesta a quimioterapias del glioblastoma

Autora: Mg. Laura Lucia Trebucq

Director: Dr. Juan José Chiesa

Co-director: Dr. Luciano Marpegan

Trabajo presentado para optar por el título de Doctora de
la Universidad Nacional de Quilmes

Laboratorio de Cronobiología

Departamento de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes

2023

Abreviaturas utilizadas

(CK-1 ϵ): caseína quinasa-1 ϵ .

A: Amplitud.

AGT: O6-alquilguanin ADN Alquiltransferasa.

AIC: 5-aminoimidazol-4- carboxamida.

AP: Anteroposterior.

ATB: Antibiótico - Antimicótico.

ATCC: *American Type Culture Collection*.

ATP: adenosin trifosfato.

AVP: Vasopresina.

BHE: Barrera hemato-encefálica.

BMAL1: *Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-1*.

CALR: Caltrina.

CLOCK: *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*.

CREs: elementos de respuesta del tipo cAMP.

CRF: Curva de Respuesta de Fases.

CRY: *Cryptochrome*.

CT: *Circadian Time*.

Cx43: la proteína canal conexina 43.

CXCL12: ligando 12 de quimiocina del motivo CXC.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

DM: Dorso-medial.

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DV: Dorsoventral.

EEM: Error estándar de la media.

EGF: factor de crecimiento epidérmico.

EGFR: Receptor del Factor de crecimiento epidérmico.

FDA: *Food and drugs Administration*.

FUDR: fluorodesoxiuridina.

GABA: Acido gamma-aminobutírico.

GAP: Proteína activadora de GTPasa.

GBM: Glioblastoma.

GCR: Genes Controlados por el Reloj.

GDNF: factor neurotrófico derivado de la glía.

GDP: Guanosín difosfato.

GEF: Factor intercambiador de guanina.

GFAP: Proteína glial fibriliar acídica.

GFP: Proteína verde fluorescente.

GLAST: transportador de glutamato/L-aspartato.

Gln: Glutamina.

GRP: péptido liberador de gastrina.

GTP: Guanosín trifosfato.

HE: Hematoxilina-Eosina.

HPA: Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal.

HPS: Horas post-sincronización.

IC50: concentracion inhibitoria 50.

Icv: Intracerebroventricular.

IDH: enzima isocitrato deshidrogenasa NADPH dependiente.

IGF-1: crecimiento semejante a la insulina tipo I.

IL: Interleuquina.

ipRGCs: células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles.

LL: Luz constante.

LO: Luz - Oscuridad.

LS: *Lomb-scargle*.

M: Mesor.

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos.

MCP-4: la proteína quimioatrayente de monocitos 4.

MGMT: o6 -metilguanina-ADN-metiltransferasa.

ML: Medio-lateral.

MMP: Metaloproteasa.

MTIC: 5-(3-metiltriazenil)-imidazol-4-carboximida.

NF1: neurofibromina 1.

NSQ: Núcleos Supraquiasmáticos.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OO: Oscuridad-Oscuridad.

PACAP: pituitario de la adenilato ciclasa.

PBS: Buffer fosfato salino.

PBS-T: Buffer fosfato salino-Triton X-100.

PEI: polietilenimina.

PER: Period.

PIR: Piruvato.

PLOD-2: 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2 lisina procolágeno.

Rac1: Sustrato 1 de toxina botulínica C3 relacionada con Ras.

RB1: retinoblastoma 1.

RFU: unidades relativas de fluorescencia.

RORE: Reve-erba Responsive Element.

rpm: revoluciones por minuto.

SDF-1: el factor 1 derivado de células estromales.

SFB: Suero fetal bovino.

sh ARN: ARN pequeño *hairpin*.

siARN: ARN pequeño de interferencia.

SNC: Sistema Nervioso Central.

STAT3: activador de la transcripción 3.

STR: *short tandem repeats*.

SXC: Anti Portador de Cisteína y Glutamato.

TAMs: macrófagos asociados al tumor.

TCGA: Atlas del Genoma del Cáncer.

TGF- β 1: factor de crecimiento transformante beta 1.

TIAM1: Proteína 1 inductora de invasión y metástasis de células T de linfoma.

TMZ: Temozolomida.

TNF- α : el factor de necrosis tumoral α .

Tp53: proteína supresora de tumores 53.

TRH: Tracto Retino Hipotalámico.

VEGF: Factor de Crecimiento Vascular Endotelial.

Veh: Vehículo.

VIP: péptido intestinal vasoactivo.

ZT: *Zeitgeber Time*.

$\Delta\psi$: Diferencia o ángulo de fase.

τ : Tau, período.

ψ : Fase.

Introducción general

1. Los ritmos circadianos en mamíferos

*“Si conocieras el tiempo tan bien como yo- dijo el Sombrero-
no hablarías de derrocharlo como una cosa.*

El tiempo es una persona.”

Alicia en el País de las Maravillas, Lewis Carrol.

1.1. ¿Qué es el tiempo?

¿De qué hablamos cuando hablamos del tiempo? Esta es una pregunta que ha desvelado a filósofos y científicos desde hace siglos. Platón, en el año 360 A.C, es de los primeros filósofos en ocuparse de la temática temporal. En sus diálogos de Timeo, Platón explica, mediante el diálogo de dos de sus personajes, que el tiempo surge como una creación de Hacedor, buscando algo que se asemejara a sí mismo. De esta manera, se crea el Tiempo (en griego, χρόνος) que cuenta con una característica muy particular: es eterno. Sin embargo, será recién Aristóteles (discípulo de Platón) quien intentará dar una primera explicación científica del tiempo, indicando que el mismo va de la mano del movimiento, definiéndolo de la siguiente manera:

“El tiempo es la medida del movimiento según el antes y el después”.

Santo Tomas de Aquino, en el siglo XIII, retomará esta definición del tiempo de Aristóteles y continuará debatiéndolo como algo externo al ser humano.

En el siglo XVII, Isaac Newton define en sus Principia al tiempo como una entidad absoluta, matemática y verdadera, el cual fluye de forma uniforme.

Será recién en 1910 cuando esta noción de tiempo se ponga en jaque por primera vez, y quien estuvo a cargo de esto fue Albert Einstein. Einstein habla por

primera vez de la relatividad del tiempo, el cual es percibido por el estado de movimiento del observador, siendo comúnmente usado en lugar del tiempo verdadero-matemático-absoluto.

En 1920, el filósofo Martin Heidegger retomará esta idea para intentar entender la relación entre las personas y el tiempo, indicando que el ser se encuentra determinado como presencia por el tiempo. Es decir, es el tiempo quien nos hace existir en tanto seres.

Todo lo antes expuesto nos demuestra que definir el tiempo es una cruzada sumamente compleja. Pese al trabajo que grandes filósofos y pensadores han hecho a lo largo de los años, el tiempo sigue siendo tema de debate, y lamentablemente, aún se nos sigue escurriendo entre los dedos. Sin embargo, hay un tiempo que ha sido estudiado en profundidad, y puede ser descrito (lo cual no ha sido tarea sencilla): el tiempo biológico. Existe un tiempo interno, que transcurre dentro de la mayoría de los seres vivos, controlado por un reloj biológico, que se acopla a las variables del entorno en el que vivimos (como el ciclo luz/oscuridad). Este reloj interno dicta los ritmos de nuestro organismo, desde el nivel celular hasta el nivel sistémico. ¿Qué son, entonces, estos ritmos biológicos? En las secciones sucesivas buscaremos responder esta pregunta, y las preguntas que se derivan de ella.

1.2. Los ritmos biológicos

En el ambiente que nos rodea, existen una diversidad de claves temporales periódicas que han marcado las condiciones de la vida en la Tierra. Ejemplos de esto son la rotación de la Tierra alrededor del sol (la cual es responsable de la alternancia entre el día y la noche, que transcurren en 24 hs.), los ciclos de iluminación lunar, que ocurren cada 28 días, o la traslación de la tierra en su órbita elíptica alrededor del sol, que genera cambios en la cantidad diaria de horas de luz (o fotoperíodo) en latitudes alejadas del ecuador, estableciendo las estaciones del año.

Estos ciclos ambientales han operado desde muy temprano como una presión de selección sobre los organismos, los cuales han desarrollado mecanismos oscilatorios o relojes endógenos capaces de medir el paso del tiempo cíclico, generando ritmos como respuestas adaptativas. Es posible clasificar estos osciladores y sus ritmos en tres categorías en función de su frecuencia: ultradianos (de frecuencia superior a 24 horas), circadianos (con una frecuencia cercana a 24 horas) e infradianos (frecuencia inferior a 24 horas), términos acuñados por Franz Halberg (Halberg, 2003). La existencia de estos relojes ha permitido a los seres vivos predecir el momento de aparición de muchos estímulos ambientales y así esgrimir de antemano las respuestas correspondientes (Golombek, 2003).

1.3. Una pequeña historia de los ritmos biológicos

La idea de que el tiempo afecta la fisiología de los seres vivos no es una idea nueva. Ya en la Grecia antigua (700 a.C.), Hesíodo notaba que “las enfermedades caen sobre los hombres, algunas de día y otras por la noche”. A su vez, en la concepción de la medicina oriental, particularmente en China, la salud es

considerada a través de una serie de opuestos (día y noche, sol y luna). El concepto del tiempo es, entonces, fundamental en esta escuela, desde el clásico texto Nei Ching del siglo III a.C. hasta el presente, pensando los diagnósticos y tratamientos en íntima relación con los ritmos biológicos (Golombek, 2003).

En 1621, el escritor Robert Burton compara al cuerpo humano con un reloj, y relaciona su falla con la posibilidad de la enfermedad de la siguiente manera:

“(..) Éste puede compararse a un reloj: si una rueda ha sido destruida, se produce una perturbación en todo el resto, pues tan admirable es el arte y la armonía que revela la creación del hombre, tan exacta la proporción entre cada una de las partes...” (Burton, 1621).

Sin embargo, no será hasta el 1700 que aparezca un verdadero experimento que busque demostrar la existencia de los ritmos biológicos. El mismo estuvo a cargo del astrónomo francés Jean Jacques d’Ortous de Mairan, a principios del siglo XVIII (De Mairan, 1729). De Mairan observó que las hojas de la planta *Mimosa pudica* se mantenían extendidas durante el día, y retraídas durante la noche. Al científico le llamó la atención este comportamiento periódico, y se preguntó por su naturaleza ¿es un ritmo exógeno que responde al ciclo luz-oscuridad o existe un mecanismo endógeno que lo sostiene?

Por lo tanto, decidió colocar la *Mimosa pudica* dentro de un armario al que no le llegaba la luz solar. Y lo que descubrió comenzaría a sentar las bases de los estudios de los ritmos biológicos (particularmente los circadianos): las hojas de la *Mimosa* se seguían moviendo diariamente, por lo que se demostró por primera vez que los ritmos circadianos eran capaces de mantenerse aún en ausencia de señales temporales del ambiente (Figura 1.1). Estos experimentos fueron continuados luego

por De Monceau y De Candolle (Emery *et al*, 2023), que determinaron que el movimiento no dependía de variaciones en la temperatura ambiental, y que ocurría con un período ligeramente diferente a las 24 horas del día. Estos experimentos serían fundacionales de una disciplina dedicada especialmente a estudiar los ritmos biológicos: la cronobiología.

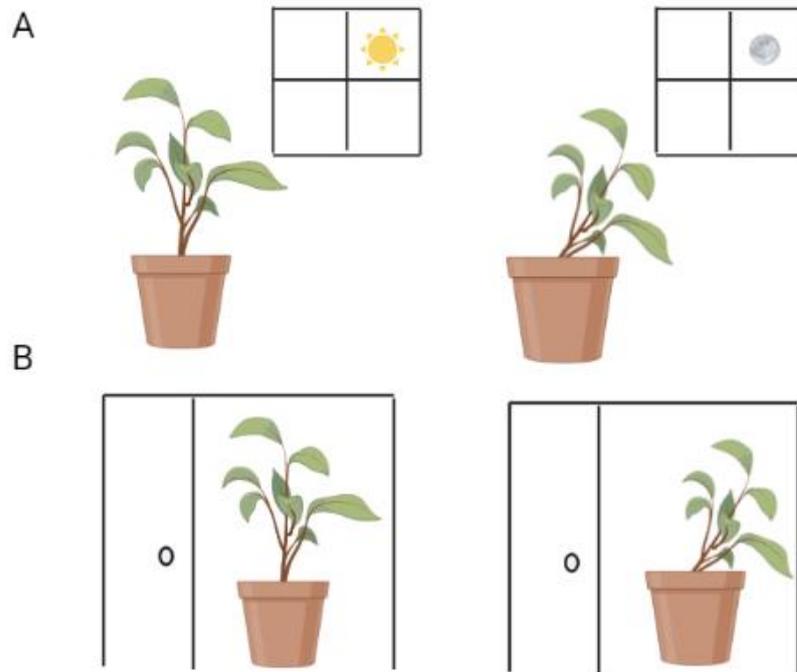


Figura 1.1. Esquema que describe el experimento realizado por Jean Jacques d'Ortous de Mairan para evaluar el movimiento de las hojas de *Mimosa pudica*. A) La *Mimosa pudica* durante el día, en presencia de luz solar, abre sus hojas y durante la noche, las cierra. B) Al colocar a la planta en un armario en oscuridad constante, se observa que el comportamiento persiste.

Con el paso de los años, la cronobiología comenzó a abocarse principalmente al estudio de los ritmos circadianos (cerca de 24 h, como ya fue definido previamente). Sin embargo, será recién alrededor de 1940 que se comienzan a formalizar los mecanismos y el funcionamiento de los ritmos

circadianos, gracias a los trabajos pioneros de Karl Von Frisch con abejas y de Erwin Bünning con plantas, y más tarde de los dos grandes padres de la cronobiología: Colin Pittendrigh y Jürgen Aschoff, quienes estudiaron profundamente los ritmos circadianos en diversas especies, desde en *Drosophila melanogaster*, hasta en seres humanos encerrados en un *bunker* bajo tierra. Estos experimentos les permitieron describir las propiedades básicas de los ritmos circadianos y formular los modelos paramétricos y no-paramétricos, que explican buena parte del mecanismo de sincronización del reloj con el ambiente, los cuales son utilizados hasta la actualidad.

En las siguientes secciones, entonces, comenzaremos a describir en profundidad los ritmos circadianos.

1.4. De sistemas circadianos y relojes biológicos

Los organismos (desde las cianobacterias hasta los seres humanos) poseen un mecanismo conocido como reloj circadiano, que les permite adaptarse y sincronizarse a las variables ambientales que cambian cíclicamente. Los ciclos de luz-oscuridad (LO) generados por la rotación terrestre son los más estables en período y fase, siendo por lo tanto las claves temporales o *zeitgebers* (proveniente del alemán “dador de tiempo”) más eficientes en la mayoría de las especies epigeas. Además de las transiciones fóticas del ciclo LO, otros estímulos diarios pueden actuar como *zeitgebers*: la temperatura, la disponibilidad de alimento y hasta las interacciones sociales (Golombek y Rosenstein, 2010).

Si bien las razones por las que los organismos poseen un reloj circadiano aún no están completamente dilucidadas, hasta el momento hay dos hipótesis fundamentales: el sistema circadiano permite la anticipación a los cambios

predecibles de la naturaleza, y no simplemente la generación de una respuesta a los mismos una vez ocurridos (lo que se conoce como homeostasis predictiva), y por otro lado, en metazoos, la presencia de un reloj central permite mantener el ritmo y la sincronización de los osciladores periféricos, en ambos casos optimizando la fisiología y el comportamiento (Golombek, 2007).

El sistema circadiano, con un oscilador central capaz de sincronizarse a variables ambientales generando los ritmos biológicos, suele representarse de forma sencilla para su entendimiento, a través de un esquema conocido como Eskinograma, en honor al científico Arnold Eskin. En dicho esquema (Figura 1.2), se muestra como un *zeitgeber* (por ejemplo, el ciclo LO) sincroniza al reloj central, el cual mediante un proceso denominado acoplamiento, genera las salidas, es decir, los ritmos circadianos en las diversas variables fisiológicas y comportamentales, como ser los ritmos de temperatura, los ritmos en diversas proteínas o el ciclo de sueño/vigilia.

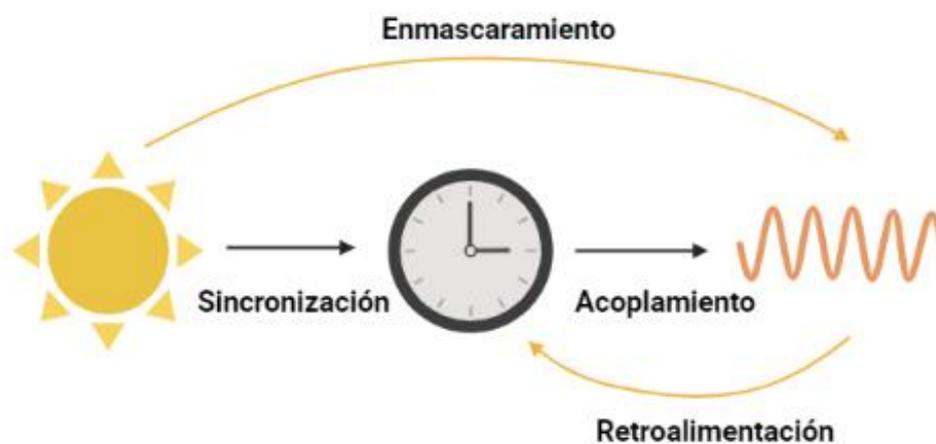


Figura 1.2. Eskinograma clásico. El agente sincronizador impacta sobre el oscilador o reloj central mediante un proceso denominado sincronización, generando (mediante un proceso denominado

acoplamiento) los ritmos biológicos en las diferentes variables fisiológicas y comportamentales del organismo. Asimismo, el agente sincronizador puede modificar directamente la variable de salida, proceso denominado enmascaramiento; y la salida puede modificar al sincronizador mediante un proceso denominado retroalimentación (ambos procesos indicados con flechas naranjas).

Estos componentes interactúan de manera bidireccional, por dos razones. La primera es que algunos componentes controlados por el reloj biológico son capaces de actuar directamente sobre el oscilador circadiano (por ejemplo, la hormona melatonina), proceso conocido como retroalimentación. La segunda responde a que un agente sincronizador es capaz de afectar directamente variables de salida (por ejemplo, la luz de elevada intensidad es capaz de inhibir la actividad locomotora en roedores nocturnos, independientemente de su efecto en el reloj), en un fenómeno conocido como enmascaramiento (Tresguerres, 2010).

Habiendo comprendido, entonces, el funcionamiento del sistema y el reloj circadiano es posible definir sus características fundamentales. Como ya mencionamos anteriormente, de Mairan con su experimento descubrió la primera característica de los ritmos circadianos: su carácter endógeno. Esto implica que la oscilación se mantiene aún en condiciones constantes o de libre curso (por ejemplo, en oscuridad constante), es decir, en ausencia del *zeitgeber*. Si al transferir al organismo a condiciones constantes, los ritmos desaparecen, se trata de ritmos exógenos, generados por el ciclo externo.

En presencia de un ciclo ambiental de periodicidad circadiana, los relojes manifiestan exactamente el período de dicho ciclo. Es decir, las oscilaciones circadianas endógenas son sincronizadas a los ciclos naturales externos por cambios en su período y/o en su fase. Y esta es la segunda característica de los

relojes circadianos: su carácter sincronizable. La sincronización mediada por la luz (sincronización fótica) es esencial para establecer una relación de fases estacionaria entre el reloj circadiano y el ciclo de luz/oscuridad (LO). Además de las transiciones cíclicas de LO, se comprobó que los ciclos de temperatura, de disponibilidad de alimento, la propia actividad comportamental, la acción de ciertas drogas o las interacciones intra e interespecíficas, pueden actuar como sincronizadores de tipo *no fótico*, es decir, no dependientes de la luz (Mistlberger, 2004).

Finalmente, la tercera propiedad del reloj circadiano es que presenta compensación frente a cambios de temperatura. Esto se refiere a que el período endógeno es estable frente a distintas temperaturas externas (Q_{10} cercano a 1), a diferencia de muchos otros procesos bioquímicos o fisiológicos que aumentan su tasa a medida que aumenta la temperatura (Golombek, 2010).

1.5. Parámetros y estudio de los ritmos circadianos

En esta sección definiremos qué parámetros se utilizan para caracterizar a los ritmos circadianos. En ese sentido, cabe destacar que son los mismos parámetros utilizados en la descripción de cualquier variable oscilatoria.

Los ritmos u oscilaciones en una variable biológica se estudian obteniendo una serie temporal de datos de la variable, la cual es analizada para obtener 4 parámetros fundamentales: el Período, que es el tiempo en que la variable completa un ciclo; el valor medio (M) a lo largo del ciclo; la Amplitud (A), que es la diferencia entre el valor máximo y el valor medio; y la fase (ϕ), que corresponde al instante en que la variable toma un valor determinado (Figura 1.3 A). Se puede tomar como valor de referencia o marcador de fase cualquier valor de la variable, por ejemplo,

el valor máximo en un ritmo bioquímico, o el inicio de la actividad en un ritmo comportamental. Para estimar los parámetros de un ritmo, se pueden realizar distintos análisis en el dominio de la frecuencia (por ejemplo, periodogramas, análisis de Fourier), o en el dominio del tiempo, como realizar el ajuste de los datos a una función cosenoidal mediante los cuadrados mínimos del residual (por ejemplo, el análisis de COSINOR (Giebultowicz, 2004).

En la Figura 1.3 B, se muestran dos ritmos con distinto período. En la Figura 1.3 C se ejemplifica un cambio de fase ($\Delta\psi$), que podría provenir de un mismo ritmo en distintos momentos (sin variaciones en el período ni en la amplitud). En este caso, la fase 2 aparece más tarde que la fase 1 y esto es lo que denominamos un retraso de fase. Por último, en la Figura 1.3 D se ejemplifican dos ritmos con distinta amplitud, pero igual período.

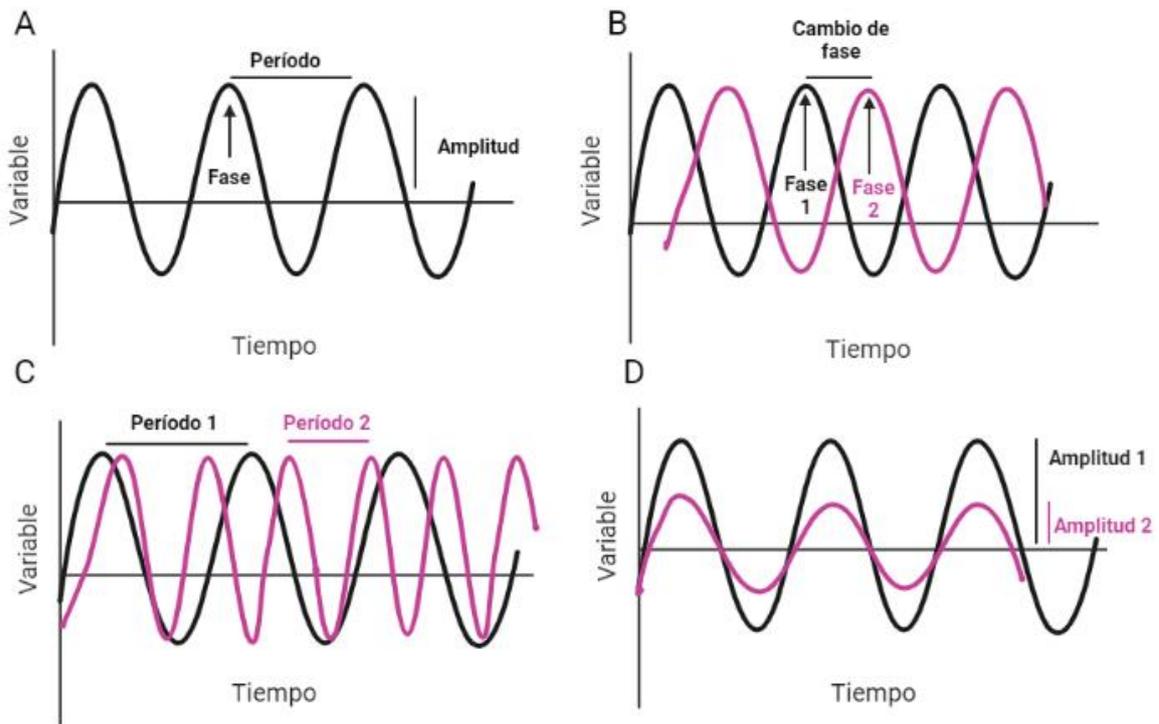


Figura 1.3. Parámetros de estudio en una variable oscilatoria. A) Dentro de una variable oscilatoria, pueden definirse tres parámetros fundamentales: la fase, el período, y la amplitud. B) Se ejemplifica un cambio de fase, a través de un retraso de fase. C) Se ejemplifican distintos períodos, siendo el período 2 menor que el 1. C) Se ejemplifican dos amplitudes, siendo la amplitud 2 menor que la 1.

A la hora de estudiar los ritmos circadianos en laboratorio, esto puede llevarse a cabo tanto a nivel *in vivo* como *in vitro*. Si hablamos de caracterizar ritmos diarios de comportamiento en animales, uno de los esquemas más clásicos es someterlos a ciclos de LO, siendo el ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (LO 12:12) utilizado de manera estándar en roedores de laboratorio, de manera tal que los animales se encuentren sincronizados al *zeitgeber*. Por otro lado, si se quiere analizar el ritmo endógeno del animal, el mismo debe colocarse en condiciones de oscuridad constante o de libre curso (OO), y el valor del período endógeno se simboliza con la letra griega Tau (τ). Además, se define como “día subjetivo” al intervalo de tiempo en el que el animal se encuentra en su fase de reposo, y “noche subjetiva” al intervalo de tiempo en el que se muestra activo (para un animal nocturno). En los ciclos LO de laboratorio, la periodicidad del *zeitgeber* se simboliza como T y se divide en horas reloj (*Zeitgeber Time*, ZT). Por convención, se define al momento de encendido de las luces como ZT0, siendo ZT12 el apagado de las luces. En condiciones de OO, la periodicidad endógena se divide en horas circadianas (*Circadian Time*, CT), las cuales se calculan como el período endógeno/24 ($\tau/24$), siendo CT12 el momento del inicio de la noche subjetiva. Esta división horaria tanto del período del *zeitgeber* como del ritmo circadiano es válida tanto para organismos diurnos (activos durante el día subjetivo) como para aquellos nocturnos (activos durante la noche subjetiva), y es necesaria tanto para administrar

estímulos experimentales como para observar las respuestas circadianas a los mismos, en momentos o fases específicas de la actividad del reloj.

En condiciones *in vitro*, por ejemplo, en células, la salida más utilizada para estudiar los ritmos circadianos es analizar de forma directa la actividad de los genes reloj (por ejemplo, los genes *brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-like 1 (bmal1)*, *Period (per) 1, 2 y 3* y *Cryptochrome (Cry) 1 y 2* mediante diferentes herramientas moleculares. La más utilizada son plásmidos con el gen que codifica para la enzima luciferasa bajo el control del promotor de algún gen reloj, los cuales permiten llevar adelante ensayos de bioluminiscencia. Dichos ensayos se basan en la utilización de luciferasas provenientes de organismos bioluminiscentes, las cuales catalizan la emisión de luz según la siguiente reacción de óxido reducción:



Como se observa, la reacción bioluminiscente requiere de adenosin trifosfato (ATP), luciferina y oxígeno (O₂) para llevarse a cabo (de Wet *et al.*,1987). En los ensayos con células vivas en condiciones normales, tanto el ATP como el O₂ intracelulares se encuentran en concentraciones saturantes. La luciferina se agrega al medio de cultivo e ingresa a las células en forma pasiva, siendo la luciferasa sintetizada por la célula en concentraciones sub-saturantes. Los plásmidos con luciferasa son una herramienta muy útil para llevar a cabo ensayos circadianos: la oscilación de la bioluminiscencia es un indicador directo de la activación rítmica mediante factores de transcripción del promotor que se encuentra dirigiendo la expresión de la luciferasa (ver “Materiales y Métodos” del Capítulo I).

Sin embargo, *in vitro* no puede utilizarse como *zeitgeber* un ciclo LO, ya que las células no presentan fotoreceptores circadianos. Por lo tanto, ¿cómo se logran medir los ritmos circadianos celulares a través de herramientas bioluminiscentes? Es necesario llevar a cabo una perturbación, como *shock* de suero, tratamientos con drogas o ciclos de temperatura (ver inciso “Los osciladores periféricos”), que ponga en fase a todas las células y genere un aumento en la amplitud (Balsalobre *et al.*, 1998). En los casos de sincronizaciones por *shock* de suero, el día se divide en horas post sincronización (HPS), indicando de esta manera el momento en que determinados procesos ocurren, frente a la imposibilidad de dividir el día en horas ZT.

Cabe destacar que los reporteros bioluminiscentes antes mencionados han generado una batería de herramientas para estudiar los ritmos circadianos, no solamente a nivel *in vitro* mediante la utilización de plásmidos, sino también a nivel *in vivo* acoplado estas construcciones reporteras a genes reloj mediante estrategias de ingeniería genética o insertando células (por ejemplo, tumorales) que poseen dichas construcciones en el cerebro de ratones. Esto permite, mediante el uso de luminómetros especiales, seguir la expresión de los genes reloj en tiempo real.

Un ejemplo de esto son los ratones Per2^{luc}, desarrollados en el laboratorio de Joseph Takahashi (Yoo *et al.*, 2004), donde la luciferasa de luciérnaga se encuentra fusionada a la proteína PER2. Cabe destacar que, a su vez en la presente tesis se utilizara esta técnica, utilizando células tumorales de glioblastoma que contienen los genes *per2* y *bmal1* acoplados al gen luciferasa y midiendo su

expresión en un luminómetro que permite registros *in vivo* (ver “Materiales y Métodos” del Capítulo I).

Existen diversas maneras de representar los datos a la hora de estudiar los ritmos circadianos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Si se dispone de series temporales cortas, por ejemplo, de pocos días de muestreo, situación más común en ensayos *in vitro*, se utiliza la representación cartesiana de las variables para detectar visualmente la presencia de periodicidades (Figura 1.4 A). Sin embargo, si se trata de series más largas, como muchos días o meses, la herramienta utilizada por excelencia es el actograma. Este gráfico es típico para analizar ritmos de actividad comportamental de un animal (de ahí su nombre), la cual puede registrarse mediante la detección del movimiento en la jaula por sensores de infrarrojo, o de la actividad en rueda por *switches reed* magnéticos, donde cada vez que el animal pasa por debajo del sensor o utiliza la rueda, se registra una cuenta, la cual se digitaliza, se suma en un intervalo de tiempo (*bin*) y se registra en una computadora. En el actograma, se grafica entonces esta serie temporal de actividad de un animal, con histogramas representando las cuentas de actividad sumadas en *bins* sucesivos a lo largo de un día. Los días sucesivos de registro se representan uno debajo del otro, y, en el caso de los de gráfica doble, esta columna de días sucesivos se duplica al lado (Figura 1.4 B). Los actogramas permiten visualizar de una forma muy clara las modificaciones en los parámetros del ritmo de actividad de los animales en los días sucesivos. Además, permiten obtener indicadores de la fase del ritmo, como el inicio o el fin de la actividad de cada día (parámetros conocidos como “*onsets*” y “*offsets*”, respectivamente), estimar el período mediante cálculos trigonométricos, etc. Por supuesto que, si bien son típicamente utilizados para datos de comportamiento, los actogramas son útiles para analizar periodicidades de

cualquier variable rítmica que pueda medirse en series de larga duración, por ejemplo, registros electrofisiológicos, de temperatura corporal, de bioluminiscencia, etc.

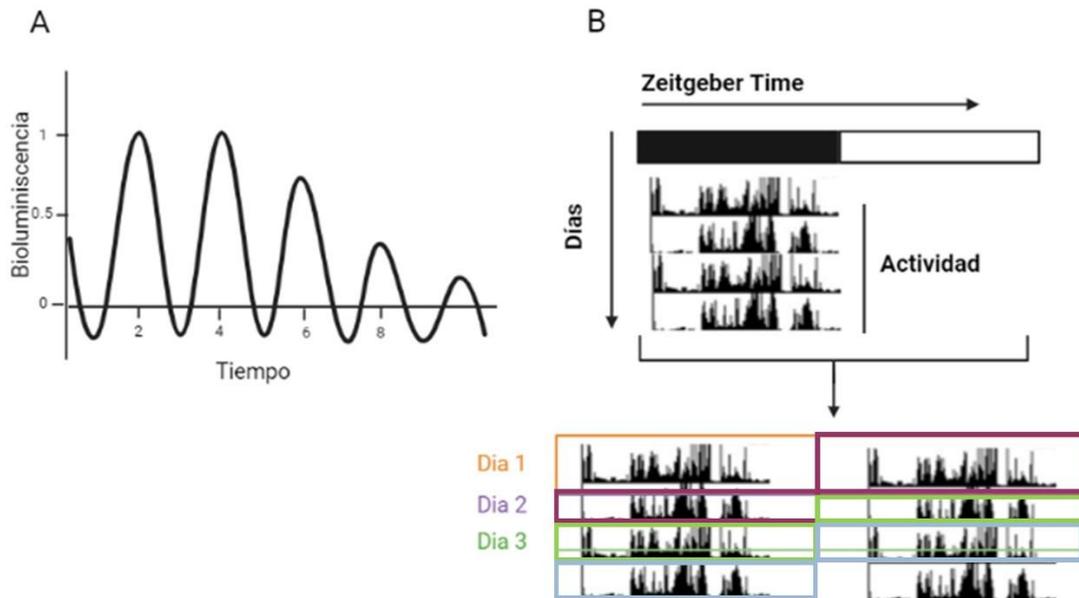


Figura 1.4. Representación de datos en el estudio de los ritmos circadianos. A) Gráfica cartesiana: Ejemplo de una variable con oscilaciones circadianas (bioluminiscencia) graficada en un esquema de ejes cartesianos simple. B) Construcción de un actograma. Panel superior derecho: Actograma de ploteo simple. Típico gráfico de un ritmo de actividad locomotora real, durante cuatro días. Se indica el registro de actividad, el cual ocurre durante la noche para un animal nocturno (ejemplo, ratón) y la ausencia de actividad durante la presencia de luz (día). Panel derecho: Construcción de un actograma *double plot*: se “corta” el día 2 y se pone a la derecha del día 1. Este procedimiento se repite en los días sucesivos: con las horas del día en el eje x, y los días sucesivos en el eje y (cada día está representado con un color diferente). Así, cuando termina el día 1, comienza (al lado) el día dos.

Si bien el actograma es el gráfico más utilizado, pueden utilizarse otros tipos de gráficos dependiendo la necesidad y la visualización de los datos que se requiera. Un ejemplo de esto son los gráficos de perfil diario o *waveform*, en los que se grafica la actividad para cada punto de la serie temporal diaria promediada en el eje Y, y las horas del día (o las horas circadianas) en el eje X.

1.6 El sistema circadiano: el reloj central

Una vez determinada la existencia del reloj biológico y los ritmos circadianos, la gran pregunta de la cronobiología pasó a ser donde se encontraba localizado dicho reloj.

Uno de los primeros experimentos que colaboró fuertemente en poder comprender la localización del reloj central fue llevado a cabo por Moore y Lenn utilizando marcadores anterógrados. Teniendo en cuenta que la luz es el principal sincronizador del reloj circadiano, los investigadores utilizaron un marcador postsináptico en los ojos para localizar el destino de la proyección, encontrando una importante marcación en unos pequeños núcleos ubicados justo por encima del quiasma óptico, a los cuales llamaron núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (Moore y Lenn, 1972).

Como bien sabemos los seres humanos hay un dicho que indica que “no se valora lo que se tiene hasta que se lo pierde”. Este dicho representa claramente los experimentos posteriores que se llevaron a cabo para confirmar la correlación entre los NSQ y los ritmos circadianos. Se optó por llevar a cabo ablaciones (eliminaciones) de los NSQ en animales, lo cual causó la pérdida de los ritmos circadianos, estableciendo entonces una correlación clara de la actividad de dichos núcleos y la generación de los ritmos (Stephan y Zucker, 1972). A su vez, estos

núcleos presentan ritmos circadianos de frecuencia de disparo en subpoblaciones neuronales, pudiendo funcionar como osciladores incluso aislados del resto del cuerpo (Inouye y Kawamura, 1979). Posteriormente, a estos experimentos de ablación se le sumaron experimentos para recuperar la actividad, los cuales fueron realizados mediante trasplantes de NSQ fetales en animales donde los NSQ habían sido lesionados (Drucker-Colín *et al*, 1984), obteniendo efectivamente como resultado la recuperación en la ritmicidad de los animales.

Por lo tanto, quedó establecido que los NSQ son el reloj central de los mamíferos. Posteriores experimentos permitieron determinar en profundidad su anatomía y función (Weaver, 1998), las cuales describiremos en los párrafos siguientes.

Los NSQ están localizados en la zona antero-ventral del hipotálamo sobre el quiasma óptico (de ahí su nombre), el punto de unión de los dos nervios ópticos provenientes de la retina, por debajo y a ambos lados del tercer ventrículo (Figura 1.5), y reciben información a través del tracto retino-hipotalámico (TRH) (Hastings *et al.*, 2018). Se sabe que las proyecciones del TRH son suficientes para mantener la sincronización de los NSQ a la luz, ya que las lesiones de este tracto impiden que los NSQ ajusten su actividad rítmica a los ciclos LO. El TRH integra tanto vías de señalización fótica como no fótica, estando las primeras asociadas a aferencias retinianas provenientes de células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs, por sus siglas en inglés) (Hattar *et al.*, 2006; Guler *et al.*, 2008), mientras que las vías no fóticas utilizan centros neuronales talámicos del sistema reticular activador ascendente, que procesa la vigilia o *arousal* (Meyer-Bernstein y Morin, 1996; Marchant y Mistlberger, 1997), siendo ambas vías

independientes de las vías clásicas que participan en la percepción visual (Aguilar-Roblero, 2014).

En el ratón, cada NSQ contiene aproximadamente 10.000 neuronas, mientras que en el humano contiene 20.000, pequeñas y densamente empaquetadas junto con células de la glía. Las neuronas y los astrocitos de los NSQ son osciladores autónomos, cada uno capaz de generar oscilaciones independientes que en condiciones normales se sincronizan entre sí (Takahashi *et al.*, 2008).

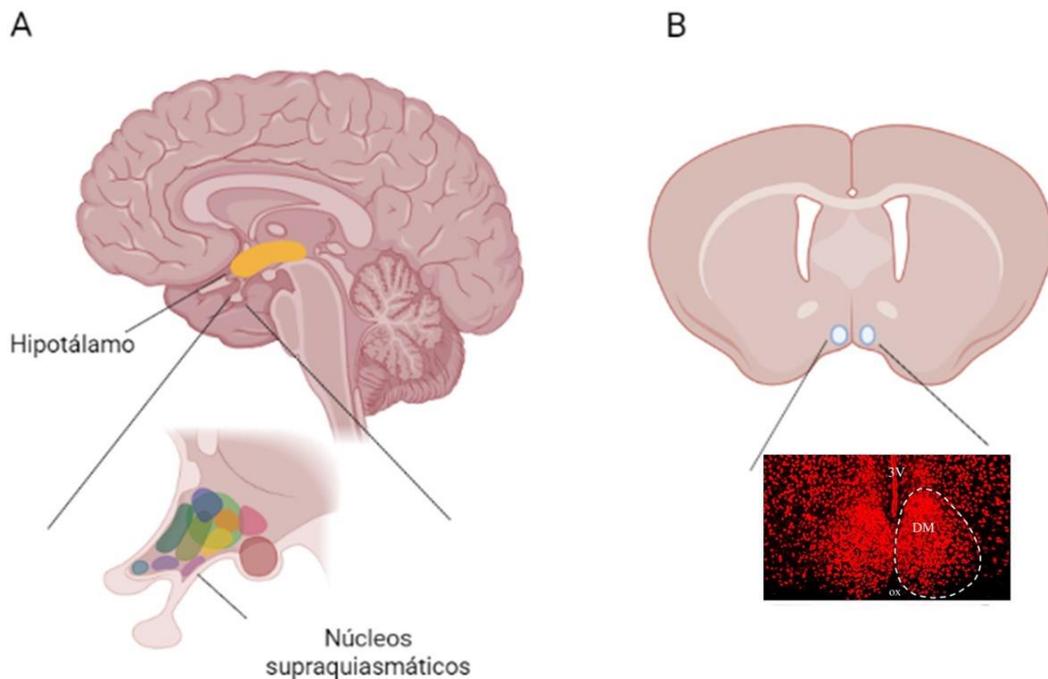


Figura 1.5. Localización de los NSQ. (A) En el humano, ubicados en un corte sagital. Los NSQ se encuentran en la base del hipotálamo, por encima del quiasma óptico. B) Localización de los NSQ de ratón, ubicados en un corte coronal. Micrografía de los NSQ obtenida de (Tesoriero *et al.*, 2018) de una tinción realizada con AVP, mostrando su ubicación debajo del 3 ventrículo y por encima del quiasma óptico

Estructuralmente se pueden encontrar dos subdivisiones anatómicas principales en cada NSQ: la región dorsomedial (DM) o *Shell*, y la región ventrolateral (VL) o *Core*. La región ventrolateral recibe aferencias desde la retina, mientras que la región dorsomedial envuelve parcialmente a la región ventrolateral y recibe sus aferencias. En primer lugar, las neuronas de cada subregión se distinguen por su contenido neuroquímico (Abrahamson y Moore 2001; Antle *et al*, 2005). La mayoría de las neuronas del *Core* contienen el péptido intestinal vasoactivo (VIP), mientras que una proporción menor contiene el péptido liberador de gastrina (GRP), neurotensina y calretinina (CALR) (Castel y Morris, 2000). Dentro de la región *Shell*, las neuronas contienen arginina vasopresina (AVP), neurofisisina, angiotensina II y metencefalina. El *Core* es la estructura que recibe principalmente señales de tipo fóticas, mientras que el *Shell* envía la mayoría de los *outputs* circadianos y recibe las proyecciones del *Core* junto con aferencias no fóticas de tipo modulatorias (Figura 1.6).

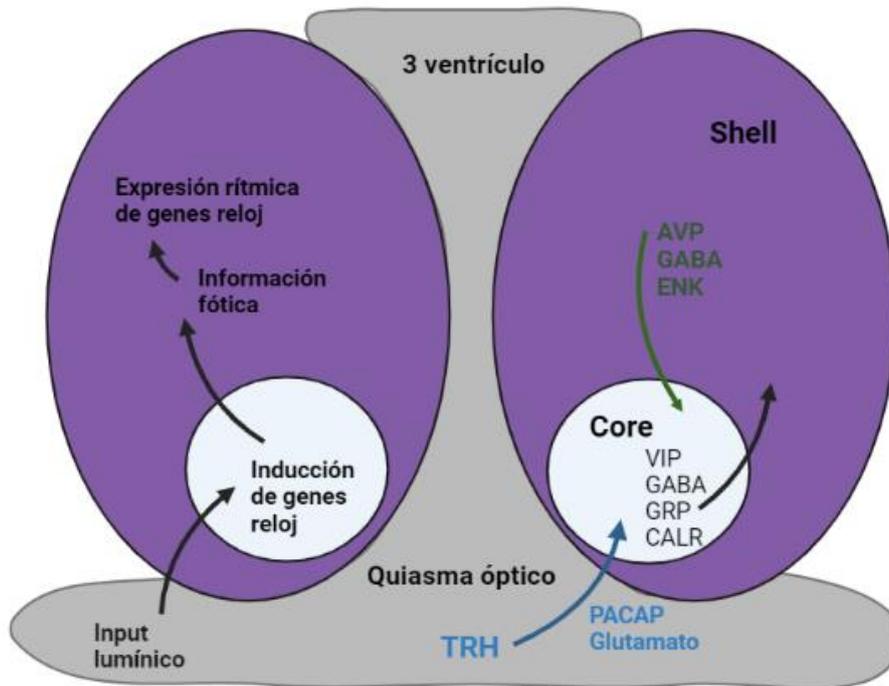


Figura 1.6. Características neuroanatómicas de los NSQ en ratón. La región *Core* recibe las aferencias del TRH, el cual envía el *input* lumínico mediante el Polipéptido activador pituitario de la adenilato ciclasa (PACAP) y glutamato. Dentro del *Core* se genera la inducción fótica de genes reloj y la producción y liberación de VIP, Ácido gamma-aminobutírico (GABA), GRP y CALR en neuronas específicas, lo cual señala a la *Shell* transmitiéndole la información fótica, el cual produce AVP, GABA y ENK en neuronas específicas, generándose en esta región la expresión rítmica de genes reloj. A su vez, existe una comunicación entre las regiones donde el *Shell* puede señalar al *Core* a través de las aferencias de las neuronas AVP, y el *Core* señala al *Shell* mediante las aferencias de las neuronas GRP. Figura realizada con información obtenida de (Yan *et al.*, 2012).

1.7. Componentes moleculares del reloj circadiano

En esta sección, hablaremos del mecanismo intracelular que permite sostener las oscilaciones circadianas tanto en los NSQ como en otras células del organismo.

El principal mecanismo molecular del reloj circadiano implica bucles de retroalimentación transcripcionales-traduccionales positivos y negativos, generados por un grupo de genes, denominados genes reloj, que se hallan altamente conservados en los animales (Lowrey and Takahashi, 2004). En el bucle de retroalimentación principal de los mamíferos, participa un factor de transcripción formado por las proteínas codificadas por los genes *clock* y *bmal1*. Las proteínas CLOCK y BMAL1 forman un heterodímero que activa la transcripción de los genes *per-1*, *2* y *3*, y *cry* *1* y *2*, además de otros genes controlados por el reloj (GCR). Dicha activación puede darse por la unión del heterodímero a sitios específicos en los genes *per* y *cry*, llamados sitios E-Box. El bucle de retroalimentación negativo es llevado a cabo por el heterodímero formado por las proteínas PER 1 ó 2 y CRY 1 ó 2, que se transloca al núcleo y se une al heterodímero CLOCK-BMAL1 para inhibir su propia transcripción. Todo un ciclo de retroalimentación dura aproximadamente 24 horas, por lo que constituye el reloj molecular circadiano (Takahashi, 2015).

Además del bucle de retroalimentación primario, existe un bucle de retroalimentación negativo secundario que implica a los receptores nucleares relacionados al ácido retinoico, REV-ERB-alpha (REV-ERB- α) y el Receptor Alpha Huerfano asociado a RAR (ROR- α). Dichos genes son activados por el heterodímero CLOCK-BMAL1. A su vez, las proteínas codificadas por REV-ERB- α y ROR- α compiten para unirse a los elementos de respuesta ROR (RORE), presentes en el promotor de *bmal1*, inhibiendo o activando su expresión, respectivamente. Estas proteínas, por lo tanto, regulan la expresión de *bmal1* (Figura 1.7). Si bien este bucle secundario no es fundamental para el reloj, se hipotetiza que le brinda robustez al sistema (Preitner *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004).

Los niveles de ARNm y de proteínas de los componentes del reloj molecular oscilan (con la excepción de Clock) en un gran número de células. En particular en los NSQ los niveles de ARNm de Per1-2 y Cry1-2 se encuentran altos durante el día, mientras que los de Bmal1 presentan su pico en la primera mitad de la noche (es decir, se encuentran en antifase). La oscilación en la activación de las secuencias promotoras E-box y RORE, dadas por CLOCK-BMAL1, y por ROR α y REV-ERB α , respectivamente, produce ritmos en la transcripción de una gran variedad de genes, no solo en los componentes del reloj molecular. Estos genes controlados por el reloj (CCG, por sus siglas en inglés) forman parte de la salida del reloj, que a través de este (y otros) mecanismos genera oscilaciones transcripcionales en alrededor del 15-20% del total del genoma (Rijo-Ferreira y Takahashi, 2019).

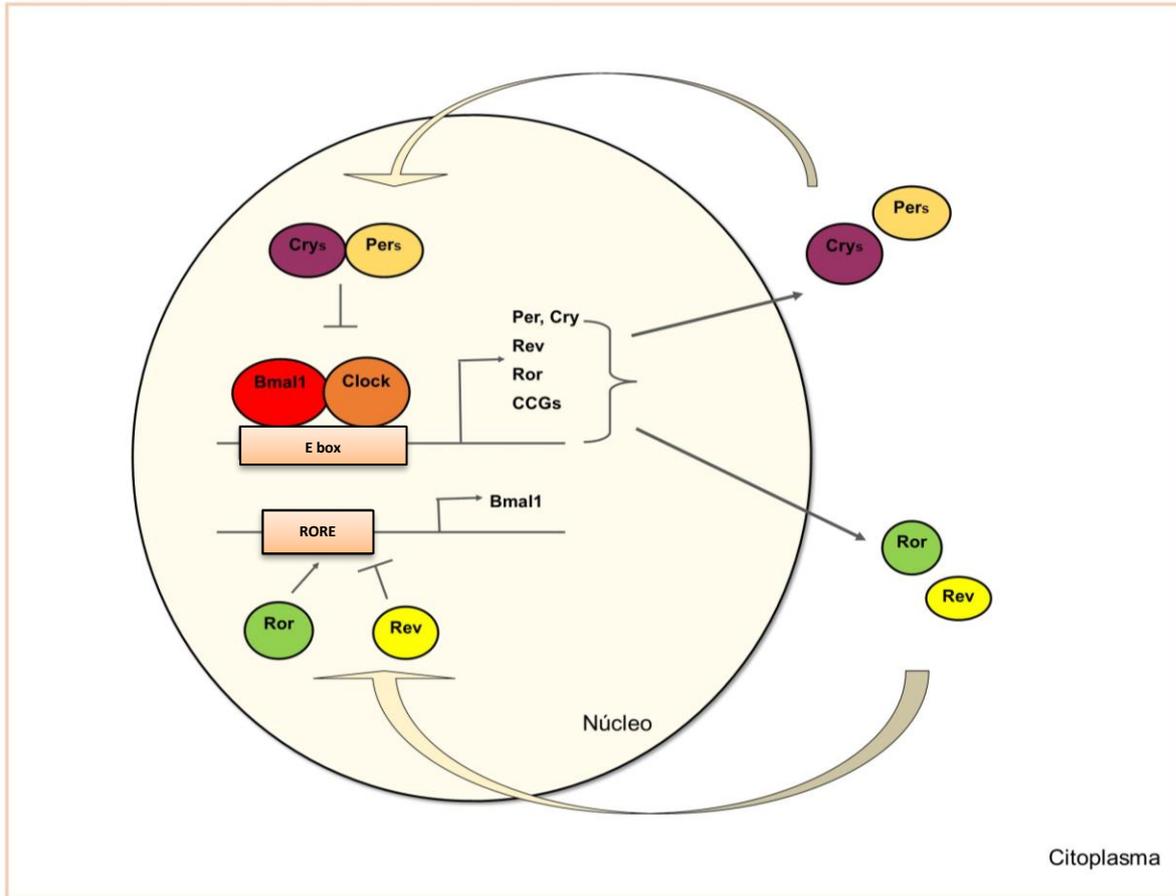


Figura 1.7. Mecanismo molecular del reloj circadiano. El dímero CLOCK-BMAL1 se une a secuencias E-BOX de diversos genes, entre ellos *Per*, *Cry*, *Rev-Erb α* (*Rev*), *Ror* y los genes controlados por reloj, activando su transcripción. Las proteínas PER y CRY heterodimerizan y, en el núcleo, se unen a CLOCK-BMAL1 inhibiendo la transcripción de los genes que tienen E-box, por tanto, inhibiendo su propia transcripción. Este *loop* primario de activación-inhibición se ve complementado por la inhibición de la transcripción de *Bmal1* mediada por *Rev-Erb α* , y la activación mediada por *Ror*, quienes se unen al elemento RORE en el promotor de *bmal1*. Estos *loops* más las modificaciones post-traduccionales de PER y CRY y la degradación regulada de las proteínas reloj, hacen que el ciclo se repita manteniendo un período de aproximadamente 24 h. Modificado de (Trebucq *et al*, 2020).

Existen niveles adicionales de control del reloj circadiano molecular, como por ejemplo el control epigenético, siendo la modificación de histonas una parte fundamental del control circadiano de la transcripción (Koike *et al*, 2012). También

existe un control postranscripcional dado por los micro-ARNs y por las proteínas de unión a ARN, que son capaces de modular los transcritos de ciertos genes reloj (Menet *et al*, 2012), generando flexibilidad adicional en el sistema (Partch *et al.*, 2014). Además, existen modificaciones postraduccionales tales como fosforilación, acetilación, metilación, y ubiquitinación, que modulan la actividad y vida media de los componentes del reloj circadiano, determinando la cinética de acumulación y degradación en distintos compartimentos subcelulares generando la oscilación transcripcional-traducciona l cada 24 h aproximadamente (Lowrey y Takahashi, 2011; Orozco-Solis y Sassone-Corsi, 2014).

1.8. El sistema circadiano: el mecanismo de sincronización

Como ya vimos en las secciones anteriores, la existencia del reloj biológico permite que los ritmos circadianos de variables fisiológicas y comportamentales persistan aún en ausencia de *zeitgebers*, presentando un periodo endógeno. Sin embargo, está claro que el sistema circadiano evolucionó en un planeta que posee variaciones ambientales diarias, por lo que su existencia tiene sentido en tanto y en cuanto se sincronice a dichas variaciones. Así, en presencia de un *zeitgeber*, el reloj biológico tendrá su período ajustado al del ciclo ambiental, en un proceso conocido como sincronización. De esta manera, un animal que posee un periodo endógeno mayor a 24 h, al ser sometido a un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (L:O 12:12) de 24 h mostrará una disminución de su periodo endógeno sincronizándose a dicho ciclo.

¿Pero cómo se da esta sincronización al *zeitgeber*? Ya a mitad del siglo XX los cronobiólogos comenzaron a estudiar este proceso. Suponiendo que las

transiciones breves de luz-oscuridad, o pulsos de luz, son las más eficientes para sincronizar el reloj, llevaron, entonces, a cabo experimentos para demostrar que la sensibilidad del sistema circadiano a la luz no es la misma en cualquier momento del día. Así, por ejemplo, si un ratón, mantenido en condiciones O:O (p ej., dentro de su refugio), recibe un pulso de luz durante la noche subjetiva temprana (simulando el atardecer), se producirá un retraso en la fase del oscilador circadiano. Contrariamente, si el pulso es administrado durante la noche subjetiva tardía (amanecer) se producirá un adelanto en la fase. Estos hallazgos se resumen en lo que se conoce como Curva de Respuesta de Fase (CRF) (Figura 1.8), que muestra cómo cambia la fase del reloj ante un estímulo aplicado en diferentes momentos del ciclo circadiano (Pittendrigh y Daan, 1976). La CRF conserva esta forma general que se ha descrito en la mayoría de las especies, si bien se pueden categorizar en función de su amplitud (es decir, cuánto es capaz de modificar su fase el reloj) en las tipo 0 (mayor amplitud, cambios de fase de hasta 12 hs) y las de tipo 1 (menores cambios de fase).

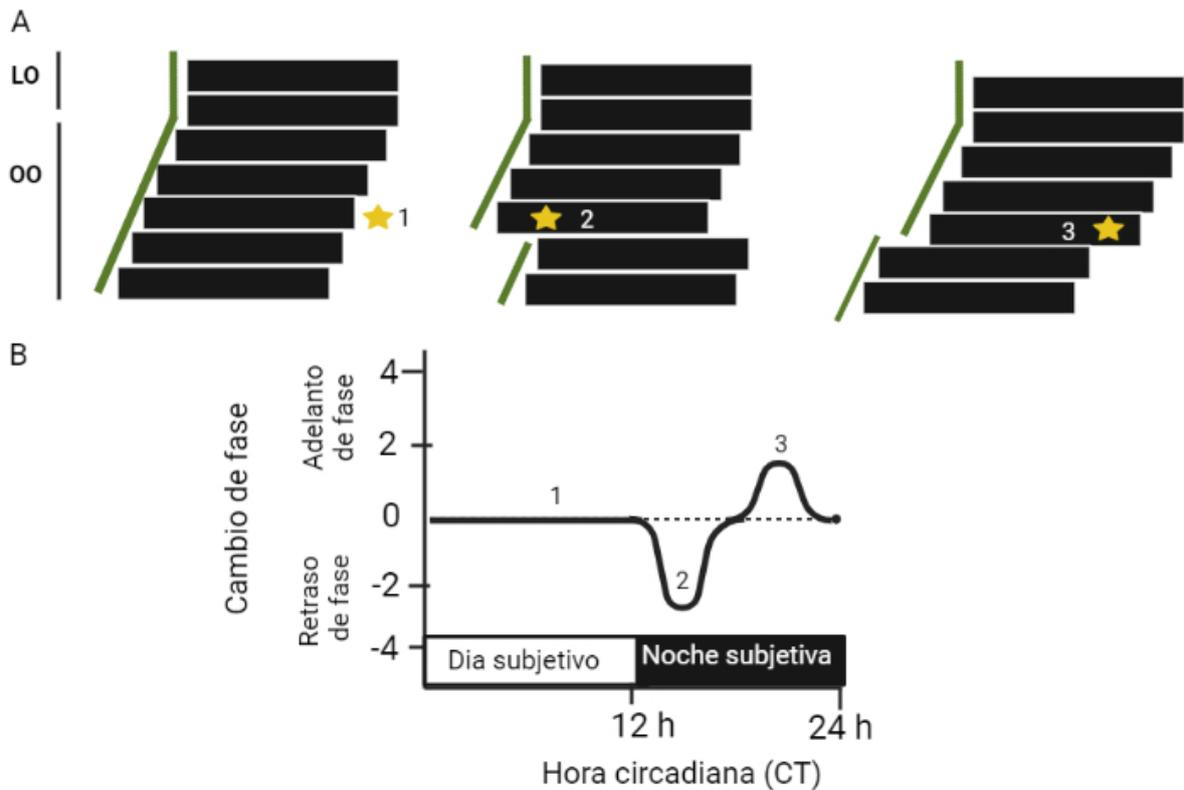


Figura 1.8. Construcción de una curva de respuesta de fase. A) Actogramas esquemáticos donde se muestran los cambios de fase generados por un pulso de luz administrado en 3 horas circadianas distintas (indicado con una estrella amarilla). En el panel izquierdo, se muestra la fase cuando el animal se encuentra en LO, y como la misma cambia al ser expuesto a un ciclo OO, evidenciando el periodo endógeno. Posteriormente, se le presenta un pulso de luz en el día subjetivo, el cual no provoca ningún cambio de fase. En el panel central, se representa la misma situación, pero el pulso de luz es presentado durante la noche subjetiva temprana, lo cual provoca un retraso de fase. En el panel derecho, el pulso de luz es presentado durante la noche subjetiva tardía, provocándose un adelanto de fase. B) Construcción de la CRF con los datos obtenidos en A. En el eje Y se muestran los cambios de fase, siendo los cambios positivos adelantos de fase y los negativos retrasos de fase. En el eje X, se muestran las horas circadianas correspondientes al día y noche subjetivos.

Esta explicación del proceso de sincronización se sustenta en uno de los modelos circadianos, la sincronización no paramétrica, definida por Pittendrigh. La sincronización no paramétrica explica la capacidad del reloj circadiano de responder

mediante cambios de fase si el organismo se expone a la luz en la noche subjetiva. Por ejemplo, si un animal nocturno abandona su refugio con anterioridad a la puesta del sol, recibirá un estímulo fótico en las primeras horas de la “noche subjetiva” del reloj circadiano. Este responde retrasando su fase, de manera que, al día siguiente, la salida del refugio se producirá más tarde, evitando así la exposición a la luz del día y ser visto por predadores.

Sin embargo, también existe otro mecanismo por el cual la luz afecta a los ritmos: la sincronización paramétrica, descrita por Aschoff (Aschoff, 1979). Aschoff propone este mecanismo de sincronización considerando que el ciclo LO ejerce efectos continuos en función de la intensidad (irradiancia/hora/ciclo) de la luz, modificando el período del reloj. Un fenómeno recurrente que llevó a Aschoff a proponer este modelo, y que formalizó en sus denominadas “reglas de Aschoff” es que, si un animal nocturno es expuesto a luz constante, su periodo se alargará al compararlo con el periodo endógeno en OO (fenómeno conocido como compresión alfa). Por el contrario, si el animal es diurno, su periodo se acortará en comparación con el periodo endógeno en OO (fenómeno conocido como compresión beta) (Aschoff, 1960; Pittendrigh, 1960). Por lo tanto, en el modelo paramétrico no se altera la fase por efectos discretos de la luz, si no el período de la oscilación, por efectos continuos. A su vez, propone la compresión o estiramiento de la CRF en función de la relación temporal entre Tau y T, es decir, la fase de *entrainment* en estado estacionario (Roenneberg *et al.*, 2010).

Si bien la luz es el principal factor sincronizador en los mamíferos, no es el único estímulo al cual el reloj es capaz de sincronizarse. Por lo tanto, la sincronización a su vez puede dividirse en fótica (similar a los efectos de pulsos de

luz), y no fótica, la cual se define por la acción de estímulos capaces de modificar la fase del reloj durante el día subjetivo (como la temperatura, disponibilidad temporal del alimento, interacciones intra e interespecíficas, entre otros). La primera está garantizada por la comunicación anatómica directa entre los NSQ y la retina, a través del TRH. La estimulación lumínica provoca la liberación de glutamato de las terminales del TRH, que actúa sobre los NSQ, produciendo retrasos o adelantos de fase en el oscilador molecular de las células, “poniendo en hora” al reloj circadiano.

Con respecto a la sincronización no fótica, si bien se han llevado adelante experimentos para describir el mecanismo por el cual se sincroniza el organismo, aún queda mucho por entender. Hace bastantes décadas, Reeb y Mrososvky (1988) plantearon una curva de respuesta de fase no fótica en hámster, siendo los estímulos no fóticos el cambio de las jaulas, la alimentación y la actividad en rueda. Estas curvas se caracterizan por tener adelantos de fase durante el día subjetivo, con un máximo en CT6, resultaron ser muy similares a las curvas de pulsos de oscuridad en hámsters sometidos a luz constante, lo cual permitió llegar a la conclusión que los efectos no fóticos son opuestos a los efectos producidos por la luz (Wams, 2017).

1.9. El sistema circadiano: los osciladores periféricos

La gran mayoría de las células y órganos del cuerpo presentan expresión de genes circadianos, por lo que se los denomina osciladores periféricos (Welsh *et al.*, 2004, Yoo *et al.*, 2004). Dichos osciladores poseen un mecanismo molecular similar al de los NSQ, y son capaces de sincronizarse con las señales enviadas por los mismos, con distintas relaciones de fase entre sí. Así, los ritmos circadianos de

ciertas funciones están determinados por el reloj propio de las células que ejercen esa función, y son capaces de ajustarse a las señales provenientes de los NSQ. Es decir, son coordinados por las salidas neuroendocrinas, autonómicas y comportamentales de los NSQ.

Sin embargo, estos osciladores periféricos pueden también sincronizarse por múltiples vías que no dependen directamente del reloj central. Por ejemplo, por la acción de ciertas drogas (como la dexametasona) (Motohashi *et al.*, 2017), hormonas (entre ellas los glucocorticoides) (Kamagata *et al.*, 2017) y factores metabólicos. Particularmente a nivel molecular, la señalización mediada por los receptores de glucocorticoides y el factor de respuesta al suero participa en su sincronización (Li y Chiang, 2014). Los osciladores periféricos pueden ser sincronizados por distintas vías aún *in vitro*, tanto en células como en explantos de tejido. Entre los estímulos capaces de sincronizarlos se encuentran distintas drogas (como dexametasona), hormonas (Mavroudis *et al.*, 2008), *shock* de suero (Nagoshi, 2005) y cambios de temperatura (Prolo *et al.*, 2005), mecanismos que emulan los procesos fisiológicos que normalmente permiten a los NSQ sincronizar a los diversos osciladores periféricos.

Por tanto, se establece un sistema jerárquico en el que la luz, por medio de la retina y del TRH, sincroniza a los NSQ y éstos por múltiples vías a los osciladores periféricos (Figura 1.9). Dicha sincronización puede ser en fase con el oscilador central, o con distintas relaciones de fase entre sí (Cuninkova y Brown, 2008; Yoo *et al.*, 2004). Este control de los NSQ sobre los relojes periféricos, estableciendo distintas relaciones de fase, brinda como beneficio, por un lado, la separación temporal de vías químicas incompatibles y por el otro, la limitación de reacciones

químicas necesarias al momento del día en que son fundamentales (Motohashi *et al.*, 2017). Un ejemplo de esto último es la limitación temporal de la producción de ácido biliar en el hígado de mamíferos solamente a cuando ocurre la digestión (Li y Chiang, 2014).

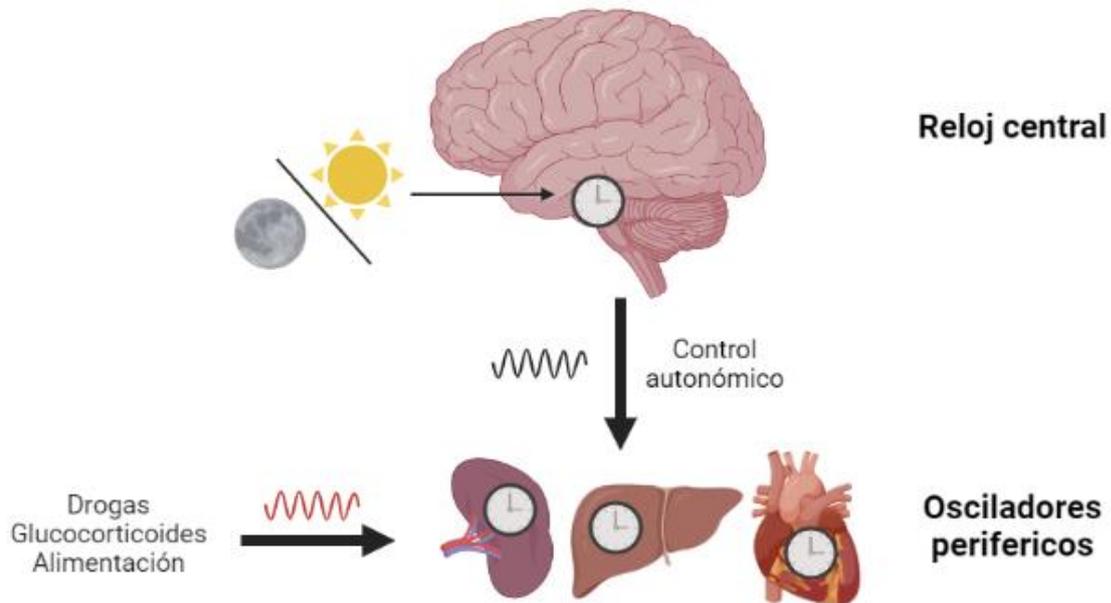


Figura 1.9 Osciladores periféricos. El ciclo luz/oscuridad impacta sobre el reloj central ubicado en los NSQ, el cual, mediante una diversidad de señales neuroendocrinas y autónomas, sincroniza “poniendo en hora” a los osciladores periféricos ubicados en diversos órganos (por ejemplo, corazón, hígado y bazo). Sin embargo, señales externas a los NSQ como las drogas, los glucocorticoides y la alimentación pueden sincronizar a dichos osciladores periféricos, con una fase diferente a la fase de los NSQ.

2. Los Gliomas

“El tiempo es la sustancia de la que estoy hecho.

El tiempo es un río que me lleva, pero yo soy el río;

es un tigre que me devora, pero yo soy el tigre;

es un fuego que me consume, pero yo soy el fuego.

El mundo, desgraciadamente, es real;

yo, desgraciadamente, soy Borges.”

Nueva refutación del Tiempo, Jorge Luis Borges.

2.1. Breve descripción de la neuroglia

El sistema nervioso central (SNC) se encuentra compuesto por dos tipos celulares mayoritarios: las neuronas y las células gliales. Si bien las neuronas han sido durante muchos años las grandes estrellas del sistema nervioso central debido a su función fundamental en la transmisión del impulso nervioso, las células gliales han comenzado en las últimas décadas a ser más estudiadas y a considerarse cada vez más fundamentales en la fisiología del sistema nervioso.

En 1846, Virchow describe a las células gliales como una estructura conectiva de soporte, a la cual llama “*nervenkitt*” (traducido al español, pegamento) (Somjen, 1988). Desde ese momento (y por muchas décadas) se mantuvo la idea de que el único rol de las células gliales es el de soporte de las neuronas, idea que ha comenzado a cambiar en los últimos años. Uno de los primeros científicos que comienza a preguntarse por la función de la glía fue Santiago Ramón y Cajal a principios del siglo XX. Sus intensos estudios y los esfuerzos que realizó para describir a la neuroglia permitieron que hoy día se encuentren cada vez más

funciones para cada una de las células de la neuroglia, y se describa su rol tanto en la salud como en la enfermedad.

Las células gliales del SNC pueden dividirse en los siguientes tipos: microglía, oligodendrocitos, glía radial, células NG2, células endoteliales y astrocitos. Las proporciones de cada tipo en el cerebro humano dependen de la región, pero de forma general puede decirse que los astrocitos representan entre un 20% y un 40%, los oligodendrocitos entre un 40 y un 50%, entre 3-10% corresponde a células NG2, 10-15% corresponde a microglía, y, finalmente, existe un porcentaje mínimo de glía radial (von Bartheld *et al.*, 2016).

Las funciones de cada tipo celular son variadas, sin embargo, serán descritas a modo general a continuación.

La glía radial está conformada por progenitores del SNC que dan lugar a las neuronas y células de la glía, y es la célula glial menos estudiada hasta el momento.

Los oligodendrocitos son los encargados de producir la mielina (compuesta en un 80% por lípidos) que recubre los axones de las neuronas garantizando el rápido impulso eléctrico saltatorio. Sin la capa de mielina, las neuronas no pueden transmitir dicho impulso, lo cual se evidencia en la severidad de las enfermedades que involucran procesos de desmielinización, como la esclerosis múltiple.

Por su parte, las células NG2 son precursores oligodendrogiales que dan lugar a los oligodendrocitos a lo largo de la vida, pero también pueden dar origen a astrocitos (Richardson *et al.*, 2011). Expresan el proteoglicano NG2 y son las células más proliferativas del SNC. Se ha demostrado que responden a la actividad sináptica mediada por glutamato y GABA, lo cual sugiere que pueden formar una red glial que dialogue con las neuronas (Trotter *et al.*, 2010).

La microglía es conocida como “los macrófagos del SNC”, cumpliendo funciones inmunológicas, eliminando cuerpos extraños, neuronas apoptóticas, entre otras (Allen y Lyons, 2018). Sin embargo, en los últimos años se han descubierto cada vez más roles de la microglía en el desarrollo y el metabolismo del SNC, demostrando que no son meros macrófagos cerebrales (Salter y Stevens, 2017). Estas células poseen además una función fundamental en la neurogénesis tanto durante el desarrollo como en la adultez, determinando qué sinapsis permanecen y cuáles deben desaparecer (Kettenmann *et al.*; 2011)

Finalmente, los astrocitos son el tipo de célula glial más abundante, junto con los oligodendrocitos, y se destacan por la expresión de una serie de proteínas distintivas, siendo la más característica la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), la cual forma parte del citoesqueleto. Estas células cumplen importantes funciones en la fisiología del SNC, entre las que se destacan: proveer soporte metabólico a las neuronas; participar en la regulación activa de la comunicación y la plasticidad sináptica; regular localmente la concentración de neurotransmisores e iones; secretar factores neurotróficos; formar la barrera hemato-encefálica, y regular la respuesta inmune del SNC (Araque y Navarrete, 2010). Cada año se descubren funciones nuevas de los astrocitos, resaltando su función fundamental en la manutención de la homeostasis cerebral, garantizando el correcto funcionamiento de las neuronas. A modo de resumen, la figura 1.10 muestra las interacciones de todas las células gliales con las neuronas.

Las alteraciones en el normal funcionamiento de las células neurogliales, particularmente de los astrocitos, tienen como consecuencia el desarrollo de diversas patologías, entre ellas algunas de las enfermedades neurodegenerativas

conocidas como el Parkinson (Wang *et al.*, 2021) y el Alzheimer (Preman *et al.*, 2021), y de tumores de diversa malignidad. Continuaremos con el rol de la neuroglia en la patología tumoral en la siguiente sección.

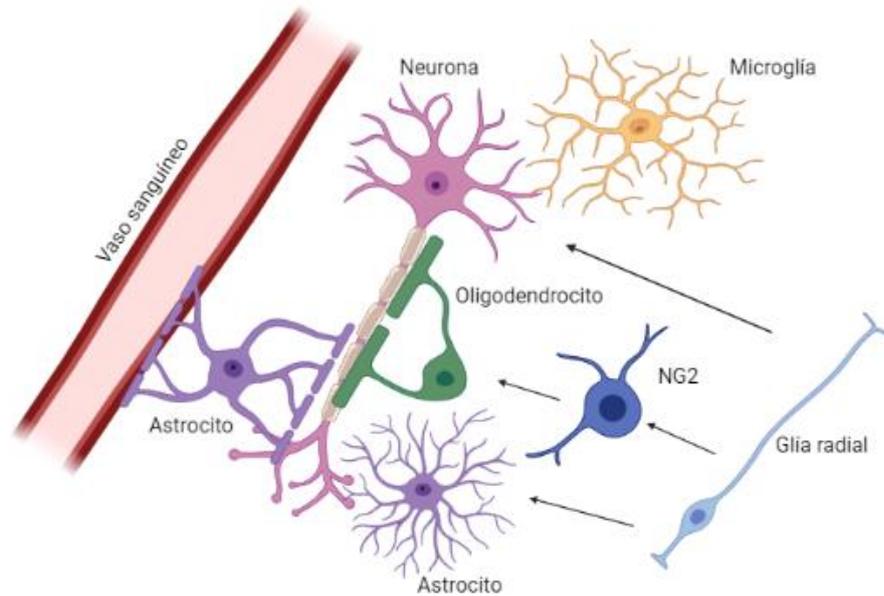


Figura 1.10. Células de la neuroglia. La glía radial es precursora de las células NG2, los astrocitos y las neuronas. Las células NG2 dan lugar a los oligodendrocitos mielinizantes, quienes recubren los axones neuronales con la vaina de mielina. Los astrocitos por su parte interactúan tanto con las neuronas como con los vasos sanguíneos, garantizando la limpieza de las terminales sinápticas y proveyendo soporte metabólico a las neuronas. La microglía garantiza eliminar células apoptóticas y cualquier cuerpo extraño que pudiera llegar a ingresar al SNC. Todas las células conjuntamente mantienen la homeostasis y el correcto funcionamiento del SNC.

2.2. Cuando el equilibrio se rompe

En los últimos años se ha profundizado en cómo las alteraciones en el funcionamiento de la neuroglia impactan en el desarrollo de patologías. Se ha demostrado que en diversas encefalopatías, la recaptación de glutamato por parte de los astrocitos se ve inhibida, generando la acumulación de moléculas tóxicas; se

ha hipotetizado que la desregulación de las funciones de la microglía puede generar desórdenes del desarrollo neuronal, como algunos de los síndromes incluidos en el espectro autista (Chen *et al.*; 2010); y se ha observado distrofia glial en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (Rossi y Volterra, 2009).

El mal funcionamiento de las células gliales y las neuronas acarrea también como consecuencia la formación de tumores malignos. Los tumores cerebrales son la segunda causa de muerte por cáncer en niños y jóvenes de entre 0 y 19 años (usualmente precedido por leucemia) (Soomro *et al.*, 2017). Entre los tumores cerebrales malignos primarios (surgidos en el SNC y no por un proceso metastásico de tumores periféricos), aquellos derivados de células de la glía (los gliomas), representan el 90%, teniendo los neuroblastomas derivados de neuronas, una incidencia menor al 10%. Dentro de los gliomas, más de la mitad son glioblastomas, formados por células tumorales astrocitarias pobremente diferenciadas (Soomro *et al.*, 2017). Los glioblastomas primarios son más comunes en la tercera edad, mientras que los glioblastomas secundarios (debidos a un proceso metastásico o por efecto secundario a tratamientos oncológicos) surgen más comúnmente en la adolescencia. Todos los años, se diagnostican 17.000 nuevos casos de glioblastoma a nivel mundial, y en Argentina la incidencia es de 5 cada 100.000 personas (Globocan-OMS, 2021). La aparición de GBMs es mayor en mujeres y a medida que aumenta la edad (Omuro y De Angelis, 2013).

El promedio histórico de vida para pacientes adultos tratados por glioblastoma es cercano a los 12 meses, con un porcentaje de supervivencia a 5 años de sólo 14% para los casos menos malignos (grado III), y cercano al 0% para

los casos de alto grado (Ohba y Hirose, 2016). Por lo tanto, el GBM está considerado el tumor cerebral más agresivo, provocando una alta mortalidad, y donde el tratamiento actual aún no ha logrado una prolongación sustancial de la esperanza de vida.

2.3. Clasificación histopatológica de los gliomas

El desarrollo normal de la neuroglia en el SNC involucra la diferenciación de células madre neurales a madre neurogliales, posteriormente a progenitores neurogliales, hasta llegar finalmente a las células completamente diferenciadas. Tanto a partir de células madre neurales indiferenciadas, como de los progenitores ya comprometidos en el linaje astrocítico, oligodendrocítico, o de células ependimarias, se pueden originar las células madre neurogliales tumorales. Las mismas dan lugar a distintos tipos de tumores gliales: ependimoma, astrocitoma, oligodendroglioma, y tumores mixtos, denominados oligoastrocitomas, con componentes astrocíticos y oligodendrocíticos (Figura 1.11) (Westphal y Lamszus, 2011).

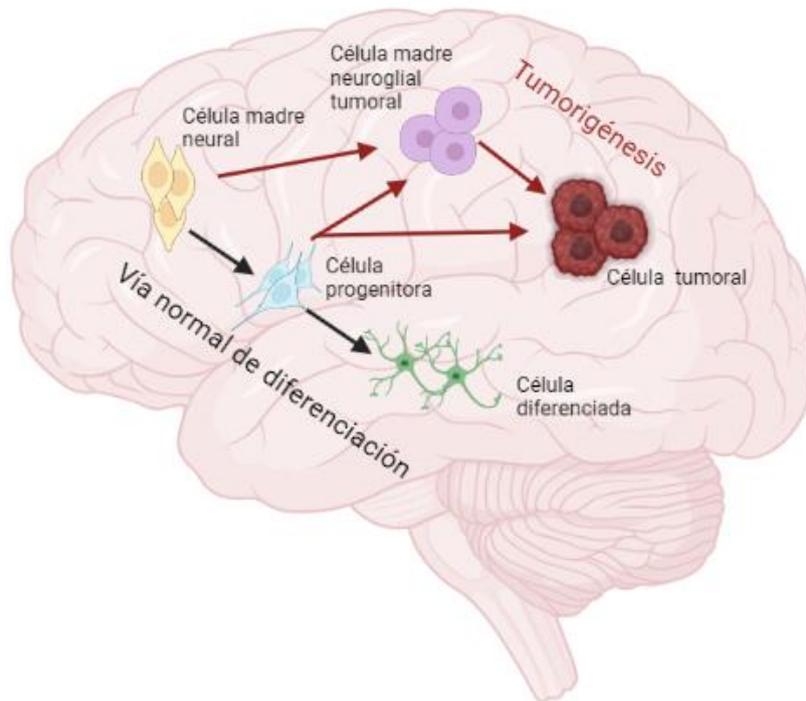


Figura 1.11. Proceso de tumorigénesis del glioma. Las vías normales de diferenciación en el SNC implican el pasaje desde células madre neurales, a través de células madre progenitoras, hasta células completamente diferenciadas (astrocitos, oligodendrocitos, neuronas). Cuando ocurre el proceso de tumorigénesis, tanto la célula madre neural como la progenitora pueden transformarse en célula madre neuroglial tumoral, las cuales se convierten, finalmente, en células tumorales. Por otro lado, la célula progenitora puede transformarse directamente en una célula tumoral, sin pasar por célula madre tumoral. La célula tumoral puede ser un astrocitoma, un oligodendroglioma o un oligoastrocitoma (ver Tabla 1).

En 1979, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una clasificación de gliomas de acuerdo con la histopatología, basándose en criterios de similitud morfológica con la célula glial progenitora de origen, y por características morfológicas asociadas al pronóstico. También estableció un sistema de gradación para gliomas que incluye los tipos I, II, III y IV para astrocitomas, y tipos I y II, para oligodendrogliomas. Los gliomas de grado I tienen una gran densidad celular, están

compuestos por células bien diferenciadas, poseen bajo potencial proliferativo, crecimiento expansivo y presentan posibilidad de cura luego de la resección quirúrgica. Los gliomas de grado II presentan bajo potencial proliferativo, crecimiento infiltrante y tendencia a la recurrencia. Estos gliomas pueden ir acumulando mayores anomalías genéticas y avanzar hacia los grados superiores de agresividad. Los tumores de grado III son lesiones con evidencia histológica de malignidad, mitosis, anaplasia y alta capacidad infiltrante. Por último, los gliomas de grado IV, conocidos como glioblastomas, son el tipo tumoral más común y el más agresivo (Salud, 2007). Pueden mencionarse, por lo tanto, las siguientes características generales de los gliomas de grado IV: proliferación exhaustiva, extensa invasividad e infiltración, neo-vascularización mediada por diferenciación de células madre neurogliales tumorales a células del endotelio vascular, necrosis y resistencia a apoptosis. Sin embargo, no poseen la capacidad de migrar y generar metástasis en otros tejidos.

En la Tabla 1 se resume la clasificación de los gliomas, según Diagnóstico y grado de la OMS.

Glioma de Bajo Grado	Diagnóstico OMS	Grado OMS
Astrocitoma difuso	Enzima isocitrato deshidrogenasa NADPH dependiente (IDH) mutado	Grado II
	IDH nativo	Grado II
	NOS	Grado II

Oligodendroglioma	IDH mutado	Grado II
	IDH mutado y 1p19q codeletado	Grado II
Oligoastrocitoma	NOS	Grado II
Gliomas de Alto Grado	Diagnóstico OMS	Grado OMS
Astrocitoma anaplásico	IDH mutado	Grado III
	IDH nativo	Grado III
	NOS	Grado III
Oligodendroglioma anaplásico	IDH mutado y 1p19q codeletado	Grado III
	NOS	Grado III
Oligoastrocitoma anaplásico	NOS	Grado III
Glioblastoma	IDH mutado	Grado IV
	IDH nativo	Grado IV
	NOS	Grado IV

NOS: estudio molecular no fue realizado.

Tabla 1. Clasificación de los gliomas según diagnóstico y grado de la OMS. Fuente: Sinning, 2017.

2.4. Clasificación molecular de los glioblastomas

A nivel molecular, los glioblastomas pueden clasificarse en cuatro grupos: mesenquimales (49% de los glioblastomas), clásicos (20%), neurales y pro-neurales (31% entre ambos). Los glioblastomas mesenquimales se caracterizan por la pérdida de neurofibromina 1 (NF1) mientras que los clásicos se caracterizan por la mutación del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Ambos expresan genes relacionados con la proliferación celular y angiogénesis y poseen una prognosis pobre. Los glioblastomas neurales son los que más se asemejan a una neurona madura, mientras que los pro-neurales expresan genes relacionados con el crecimiento neuronal y se asocian a mutaciones en la proteína supresora de tumores 53 (Tp53). Ambos poseen mejor prognosis (Phillips *et al.*, 2006; Verhaaj *et al.*, 2011)

El avance de las técnicas de secuenciación y análisis genético ha permitido identificar en los últimos años tres vías de señalización frecuentemente alteradas en el GBM: la vía TP53, que afecta al 87% de los tumores; la vía de retinoblastoma 1 (RB1), que afecta al 78%; y la vía RTK/PI3K/PTEN, que afecta al 88% de los GBM (Castañeda *et al.*, 2015).

En la tabla 2 se resumen las mutaciones genéticas más comunes implicadas en estas rutas, siendo mayoritarias la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 10q (en GBMs primarios), y la mutación en el dominio de unión al sustrato de la IDH tipo 1 y 2, que participa en la conversión de isocitrato a alfa-cetoglutarato en el proceso de producción de NADPH (en GBMs secundarios).

Alteración genética	Glioblastoma primario (%)	Glioblastoma secundario (%)
Pérdida de heterocigosidad en 10q	70	63
Amplificación del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR)	35	8
Mutación de p53	30	65
Metilación del promotor de mgmt	42	80
Mutación de la isocitrato deshidrogenasa (IDH)	5	79

Tabla 2. Mutaciones mayoritarias en glioblastomas. La columna “GBM primario” corresponde a los porcentajes de genes mutados en GBM que surgen espontáneamente, mientras que la columna “GBM secundario” corresponde a los genes mutados en GBM surgido por procesos metastásicos debidos a la invasión de células tumorales provenientes de otros tejidos. Fuente: (Soomro *et al*, 2017).

Se observa también la activación de oncogenes, como el EGFR, implicado en la ruta PTEN. La amplificación de este gen genera mayor proliferación y migración celular. También hay mutaciones en los elementos de control del ciclo celular (p53, ruta Tp53) e hipermetilación de genes, como la metilación del promotor

de O6-metilguanina-ADN-metiltransferasa (MGMT). Es importante destacar que la amplificación de EGFR es mutuamente excluyente de la mutación Tp53.

Una mutación fundamental de los GBM no asociada a las vías antes mencionadas (y resumidas en la tabla 1) es la del gen *eaat2*, que codifica para el transportador del aminoácido excitatorio glutamato (Lehre *et al.*, 1995). La inactivación de dicho gen promueve uno de los mecanismos centrales en la migración y el crecimiento tumoral dentro del ambiente restringido del cráneo. La migración de los glioblastomas implica la eliminación progresiva de las neuronas y de células gliales mediada por excitotoxicidad glutamatérgica (Ogunrino y Sontheimer, 2010; Hartley *et al.*, 1993). El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio, el cual activa receptores glutamatérgicos en neuronas post-sinápticas, y en condiciones no patológicas es eliminado del espacio sináptico por los astrocitos adyacentes mediante los transportadores de glutamato dependientes de sodio, EAAT1 y EAAT2 (Zschocke *et al.*, 2007). Por lo tanto, los astrocitos tienen la función de eliminar el glutamato para el correcto funcionamiento de la sinapsis, pero también para evitar la acumulación de concentraciones elevadas del aminoácido a nivel extracelular en otras regiones sinápticas. El glutamato es un inhibidor competitivo de la cisteína, por lo tanto, la acumulación de dicho aminoácido provoca una disminución en la captación de cisteína, lo cual genera acumulación de oxidantes celulares, toxicidad y muerte de las neuronas adyacentes (Murphy, Schnaar y Coyle, 1990). Por otro lado, los GBM sobreexpresan el transportador en anti-porte de cisteína y glutamato (SXC) (entrada de cisteína mediante salida de glutamato), por lo que secretan grandes cantidades de este último aminoácido (Araque *et al.*, 1998; Robert y Sontheimer, 2014). Este hecho, junto a la falta de los transportadores EAAT

en los glioblastomas, genera un microambiente tóxico que va eliminando las células normales circundantes (Watkins y Sontheimer, 2012).

Todo lo antes expuesto demuestra que el GBM es una enfermedad altamente heterogénea, lo cual complejiza el diseño de nuevos tratamientos para mejorar la expectativa de vida de los pacientes. Sin embargo, la identificación de todas estas mutaciones genéticas ha servido para el establecimiento de biomarcadores predictivos de respuesta terapéutica y pronóstico, lo cual tiene un alto impacto en el tratamiento. En ese sentido, es importante destacar que la secuenciación de ARN a gran escala de los GBM ha permitido en los últimos años demostrar un patrón de expresión relacionado al sexo en los GBM, donde se observan expresiones diferenciales tanto de genes del ciclo celular, como de aquellos implicados en la replicación del ADN, permitiendo detectar marcadores específicos del GBM en mujeres (Cui *et al.*; 2021).

2.5. Tratamiento de los glioblastomas

Los GBM poseen una gran capacidad infiltrante, por lo que su remoción quirúrgica completa se hace prácticamente imposible. Además, dependiendo de su localización cerebral se corre un elevado riesgo de pérdida de funcionalidad y muerte. El tratamiento más empleado en la actualidad para los GBM es una combinación de cirugía, radioterapia, y quimioterapia con Temozolomida (TMZ), un agente alquilante del ADN (Watkins y Sontheimer, 2012), llevando la mediana de supervivencia a 14,6 meses en adultos (Stupp *et al.*, 2005). El uso de TMZ en casos pediátricos no produjo aumentos en la supervivencia, pero su utilización es común

debido probablemente a que es la droga que presenta menores efectos secundarios hasta el momento (Wolff, 2012).

En los últimos años se han desarrollado nuevas terapias para el tratamiento de los GBM, pero ninguna ha demostrado ser superior a la TMZ. Por un lado, se ha desarrollado y probado el bevacizumab (comercializado como Bevac, de la empresa ELEA), un anticuerpo IgG1 recombinante monoclonal que reconoce al Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés). Dicho anticuerpo fue aprobado en el 2009 por la *Food and Drugs Administration* (FDA) de Estados Unidos de América para el tratamiento de pacientes con GBM recurrente (FDA Drug Approval Summary, 2009). Sin embargo, el aumento en la sobrevida con bevacizumab es de 2 meses respecto de la terapia con TMZ, lo cual no genera grandes mejoras en la esperanza de vida de los pacientes con GBM. Además, solo se encuentra indicado para pacientes con gliomas de grado IV (Johnson *et al.*; 2018).

Las inmunoterapias han ganado mucho lugar en los últimos años para el tratamiento del GBM. La mayoría de ellas se están volcando a bloquear los macrófagos asociados al tumor (TAMs, por sus siglas en inglés), quienes colaboran en el escape de las células de glioblastoma del sistema inmune, lo cual refleja los múltiples mecanismos de evasión y escape inmunitarios que poseen estos tumores altamente heterogéneos.

Los TAMs sobreexpresan el ligando PD-L1, por lo que las drogas nivolumab e ipilimumab, bloqueantes de PD-L1, fueron probadas recientemente en estudios de fase clínica I (Wagle *et al.*, 2020). Estas estrategias han sido combinadas con radioterapia y bloqueantes de CTLA-4 (presente en las células T regulatorias) (Singh

et al., 2021) de manera tal de potenciar los efectos del tratamiento. En resumen, las inmunoterapias podrían brindar una estrategia prometedora para el tratamiento del GBM, pero aún tienen que demostrar una mejora significativa en la supervivencia de los pacientes con glioblastoma (Singh *et al.*, 2022).

3. Interacción entre los ritmos circadianos y el cáncer

“Me dejé bañar por la luz que dejaba pasar el vitral.

Luz que venía del cielo y del tiempo...

... como toda luz”

Mort Cinder, Héctor German Oesterheld y Alberto Breccia.

3.1. La desincronización circadiana como factor de riesgo de cáncer

El reloj circadiano de los mamíferos en los NSQ controla la temporalidad en el comportamiento y la fisiología a nivel sistémico, celular y molecular (ver inciso “El Sistema Circadiano”). La estricta regulación de los osciladores periféricos permite que los ritmos biológicos en los distintos órganos se ejecuten coordinadamente, en relaciones de fase adecuadas para mantener la homeostasis predictiva y el orden temporal interno del organismo.

La vida moderna nos ha llevado a vivir bajo diversas condiciones de disrupción crónica de los ritmos biológicos, generadas principalmente por exposición alterada al ciclo de LO, exposición a la luz durante la noche y por horarios alterados de ingesta-ayuno. Ejemplos de esto son el trabajo en turnos rotativos, los viajes transmeridianos frecuentes, el jet-lag social (la diferencia en la cantidad de horas que una persona duerme en los días laborales y en los días libres) y la exposición nocturna a la luz, por ejemplo, en salas de internación, en ambientes urbanos o por la permanente exposición a pantallas (computadoras, celulares, entre otros). Estos esquemas de luz generan problemas en el organismo debido a la

resincronización permanente del reloj y a la desincronización entre los órganos y sus variables fisiológicas, aumentando el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Peter *et al*, 1999), de síndrome metabólico (Karlsson *et al*, 2001; Karlsson *et al*, 2003; Al-Naimi *et al*, 2004), y el riesgo de contraer cáncer (Schernhammer *et al*, 2003; Stevens, 2005).

En este contexto, hay diversas evidencias sobre la importancia del reloj circadiano en la progresión tumoral. Se ha observado en modelos murinos portadores de tumores, que adelantos sistemáticos en la fase del ciclo de LO (por ejemplo, de 6 hs cada 2 días, protocolos conocidos como *jet-lag* crónico) promueven la desincronización circadiana de los órganos periféricos, acelerando la progresión tumoral (Schernhammer *et al*, 2003, Aiello *et al*, 2020). La exposición a luz constante también ha demostrado ser un factor que acelera la progresión tumoral en modelos murinos para diversos tipos de cáncer, como el hepático (Abdraboh *et al*, 2022) y el de mama (Anisimov, 2012). Particularmente, salvo en un modelo heterotópico de desarrollo de tumor subcutáneo (Guerrero-Vargas *et al.*, 2017), no se han estudiado los efectos de la luz constante sobre la progresión de GBM, y solo hay un estudio reciente que analiza el impacto del *jet-lag* crónico sobre la expresión de genes asociados a dicha progresión (Khan *et al.*, 2021). Finalmente, en humanos se ha reportado que el trabajo en turnos rotativos promueve la incidencia de ciertos tipos de cáncer (Gutiérrez-Monreal *et al.*, 2016; Wolff *et al.*, 2013), siendo declarado factor de riesgo por la OMS (Filipski *et al.*, 2004). Por lo tanto, se evidencia que la desincronización circadiana del organismo tiene un impacto directo sobre la progresión e incidencia del cáncer.

3.2. El reloj molecular en las células tumorales

En la sección anterior hablamos sobre cómo la desincronización circadiana del organismo es un factor de riesgo para la aparición del cáncer. Sin embargo, esta no es la única interacción entre el cáncer y el reloj circadiano. Como ya mencionamos en la sección “Los osciladores periféricos”, muchas células del organismo presentan oscilaciones circadianas, las cuales persisten fuera del organismo, y las células tumorales no son la excepción a esta situación. Hace ya muchos años se comenzó a estudiar si las células tumorales presentaban oscilaciones circadianas en genes reloj. Si bien muchas células tumorales no las presentan, se han reportado ritmos circadianos estables en diversas líneas celulares tumorales, así como también en células tumorales provenientes de cultivos primarios de pacientes, siendo los períodos mayores, iguales o menores a 24 horas, dependiendo del tipo tumoral y del paciente (Gutiérrez-Monreal *et al.*, 2016; Chun *et al.*, 2015). Particularmente, en los GBMs se han encontrado oscilaciones circadianas en diversos tipos celulares, entre los que se encuentran C6 (Fujioka *et al.*, 2006), U-87 (Gwon *et al.*, 2020), U251 (Jung *et al.*, 2013), T98 (Wagner *et al.*, 2018) y tumores primarios de pacientes (Slat *et al.*, 2017), entre otros.

Cuando dichos ritmos circadianos son abolidos en las células tumorales mediante técnicas de ingeniería genética, se han evidenciado diferentes resultados, dependiendo del tipo de cáncer y de la línea celular, lo cual ha llevado a hipotetizar que un mismo gen reloj puede actuar como gen supresor de tumores u oncogen, dependiendo del propio proceso tumoral. Estudios clínicos mostraron una expresión aberrante de genes reloj en varios tipos de cáncer, por ejemplo, se ha demostrado una baja expresión de *per1* y *per2* tanto en cáncer de mama como en cáncer

gástrico humano, carcinoma escamoso de cabeza, cuello y oral, y cáncer de próstata (Chen *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2012; Hsu, 2014).

Qu *et al* (2023) demostraron que al silenciar los genes reloj *bmal1* y *clock*, la proliferación celular se vio disminuida en un modelo de hepatocarcinoma celular, hipotetizando que *bmal1* actúa como un gen promotor de la proliferación tumoral, lo cual también fue propuesto en otros trabajos con diversos tipos de cáncer, como cáncer de colon (Zhang *et al.*, 2021), y cáncer de mama (Wang *et al.*, 2019).

Por su parte, Jung *et al* (2013) demostraron que al silenciar *bmal1* en un modelo de cáncer de pulmón la proliferación se vio aumentada, hipotetizando su rol como gen supresor de tumores. Resultados similares se observaron en otros modelos tumorales, como el carcinoma nasofaríngeo (Zhao *et al.*, 2022) y el osteosarcoma, donde frente a un silenciamiento de *bmal1*, se observó que las células ganan la capacidad de escapar al arresto del ciclo celular en situaciones de daño en el ADN, promoviendo así la proliferación tumoral (Mullenders *et al.*, 2009).

Particularmente en GBM se han encontrado también evidencias para ambos roles de *bmal1*, demostrando la heterogeneidad de este tipo tumoral. Al silenciar *bmal1* en las células U87 (Gwon *et al.*, 2020) y U251 (Jung *et al.*, 2013), se observó un aumento de la proliferación y migración tumoral. Sin embargo, al silenciar *bmal1* en células madre de GBM se observó que, al implantar las células en ratones *nude*, no se generan tumores, hipotetizando que *bmal1* posee un rol de oncogén en ese tipo celular (Dong *et al.*, 2019).

3.3. El reloj molecular y el ciclo celular

Por lo expuesto en la sección anterior, se evidencia que el crecimiento tumoral puede ser regulado por genes que son parte del reloj circadiano. Entonces, la pregunta que surge es: ¿cuál es la relación entre el reloj circadiano y el ciclo celular? En esta sección, responderemos a esta pregunta, basándonos en los estudios que se han llevado adelante en los últimos años.

Hace ya más de tres décadas, los científicos comenzaron a preguntarse si había interacciones entre estos dos ciclos (circadiano y celular). De esta forma, demostraron que proteínas reloj como BMAL1 y PER1 controlan a una diversidad de proteínas implicadas en el ciclo celular (Figura 1.12). Por ejemplo, se demostró que BMAL1 induce de forma directa la expresión de la proteína WEE1 (implicada en la fase M del ciclo celular) (Matsuo *et al.*, 2003), de Ciclina D (fundamental para la transición M a G1) (Zhang *et al.*, 2018), y B (fundamental para la transición G2 a M) (Farshadi *et al.*, 2019), y de forma indirecta, la expresión de p21 (Gréchez-Cassiau *et al.*, 2008).

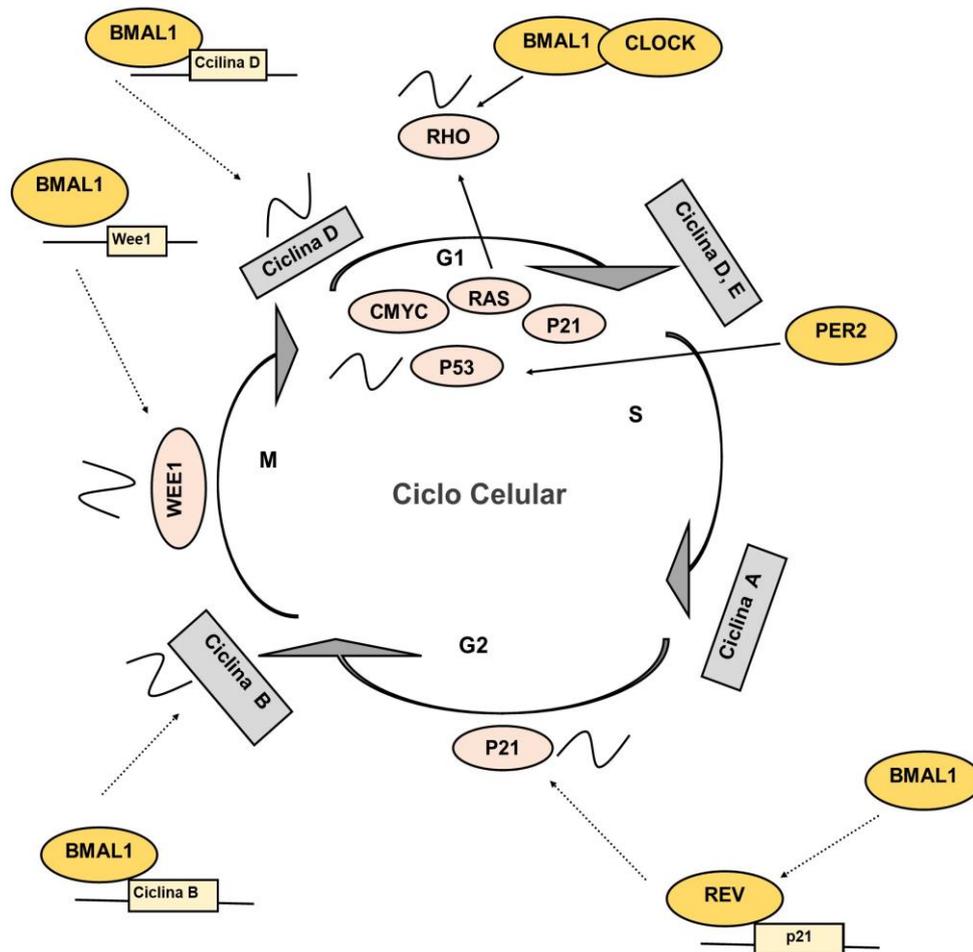


Figura 1.12. Control circadiano del ciclo celular. BMAL1 controla directamente la expresión del inhibidor quinasa Wee1, ciclina B (desencadena la transición G2/M), ciclina E (desencadena la transición G1/S) y Ciclina D (presente en M y G1) (flechas punteadas). También controla indirectamente al inhibidor p21, vía REV-erb (BMAL1 controla la expresión del gen reloj REV-erb, que controla la expresión de p21). CLOCK y BMAL1 estabilizan la GTPasa RHOA monomérica, una proteína que está río abajo de la vía de RAS, controlando los componentes de la ruta RhoA-ROCK-CFL para promover la formación de actina F y la proliferación celular. PER2 modula la estabilidad de P53 (flechas llenas). Las proteínas que presentan ritmos circadianos están señaladas con una onda. Modificado de (Trebucq *et al*, 2020).

Por otra parte, existen evidencias que demuestran que *per1-2* inhiben la proliferación de células tumorales, actuando como genes supresores de tumores (Gery *et al.*, 2005; Gery, *et al* 2006). Fu *et al.* demostraron que la inhibición de *per1* disminuye la expresión de p53, p16 y p21, y aumenta la de ciclina D1, B1 y E (Fu *et al.*, 2016). Además, también se ha demostrado que PER2 modula la estabilidad de p53 e induce la transcripción de genes diana de p53, como BAX y SFN (Gotoh *et al.*, 2014), lo cual demuestra que *per2* juega un papel importante en la regulación de la vía de p53 y la supresión de tumores.

Teniendo en cuenta lo antes expuesto, se puede concluir que una desregulación o expresión aberrante en los genes reloj implica la desregulación del ciclo celular, promoviendo, en última instancia, el desarrollo tumoral (Katamune *et al.*, 2016).

Estas evidencias demuestran que el reloj circadiano resulta de central importancia en el desarrollo y establecimiento del cáncer, y que, a su vez, su rol es complejo y depende no sólo del tipo de tumor, sino también del tipo de gen reloj y de la oscilación molecular que muestra la línea celular: algunos genes reloj pueden ser promotores de progresión tumoral en ciertos tipos de cánceres, mientras que otros pueden comportarse como supresores de tumores en otros. Por lo tanto, resulta imprescindible estudiar en profundidad la interrelación entre el sistema circadiano y el proceso tumoral para diseñar estrategias terapéuticas que tengan en cuenta a los genes reloj como blancos terapéuticos, así como ritmos circadianos en la efectividad de tratamientos, para mejorar la sobrevida y condiciones de vida de los pacientes.

La presente tesis doctoral se centra en el estudio de esta interacción en el GBM, particularmente investigando cómo el reloj circadiano controla la progresión del tumor a nivel de proliferación y prognosis (Capítulo I), en la interacción con su microambiente tumoral (Capítulo II) y en la respuesta del tumor a quimioterapias (Capítulo III).

Hipótesis y objetivo general

Teniendo en cuenta lo expuesto en la “Introducción”, se evidencia que el reloj circadiano influye sobre la fisiología de los diversos tipos de cáncer. Los GBM son tumores particularmente complejos en los que una diversidad de células interactúa (tanto dentro del tumor como con su microambiente) generando diferencias en la progresión, la invasión, la prognosis y la respuesta a quimioterapias, entre otros. En ese sentido, son pocos los estudios que se centran en describir la influencia del reloj circadiano en la fisiología del GBM, estando los mismos centrados especialmente en el estudio de la relación reloj-célula madre, buscando un mecanismo que impida la generación del tumor. Sin embargo, no hay estudios que se centren en estudiar la fisiología y la interacción reloj-GBM una vez establecido este último. Por lo tanto, partiendo de la hipótesis que el reloj circadiano de las células tumorales y del organismo portador, regulan la progresión tumoral, la interacción tumor-microambiente y la respuesta a quimioterapias, el objetivo general de la presente tesis consiste en estudiar cómo la alteración del reloj circadiano modifica dichos parámetros tumorales.

Materiales y métodos generales

1.1. Cultivo celular

1.1.1. Línea celular LN229

La línea celular [*American Type Culture Collection (ATCC) CRL-2611*] fue establecida inicialmente a partir de células pertenecientes a una paciente de 60 años con astrocitoma de grado IV. Son células adherentes *in vitro* y tumorigénicas en implantes xenogénicos en ratones *nude*. La misma fue generosamente cedida por la Dra. Georgina Cardama, del Laboratorio de Oncología Molecular, UNQ.

El genotipo celular fue confirmado luego de los dos años de uso mediante PCR y secuenciación (Productos Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina) y *Short Tandem Repeats (STR)* (Easy DNA, Buenos Aires, Argentina). Con la PCR y la secuenciación se buscaron los siguientes oncogenes, que corresponden a la vía TP53 mutada de las células LN229: PTEN wt, mutación Pro98Leu en p53, y las deleciones p14 ARF y p16. Las deleciones de p14 y p16 fueron confirmadas mediante PCR y las secuencias de PTEN y p53 fueron las esperadas.

El perfil STR fue llevado a cabo acorde a las recomendaciones de ATCC, obteniéndose los siguientes resultados: Amelogenin: X, CSF1PO: 12, D13S317: 10,11, D16S539: 12, D5S818: 11, 12, D7S820: 8, 11, TH01: 9.3, TPOX: 8, vWA: 16, 19, los cuales son consistentes con el perfil indicado por ATCC para la línea celular LN229.

A lo largo de la tesis se utilizó a su vez la línea celular LN229E1, modificada genéticamente. Su obtención se describe a lo largo del Capítulo I.

1.1.2. Líneas celulares LN229-Per2luc y LN229-Bmal1luc

Las células con constructos reporteros de genes reloj LN229-Per2-luc y LN229-Bmal1-luc fueron utilizadas en el Laboratorio del Dr. Erik Herzog en la Universidad de Washington en Saint Louis, EE. UU. Las mismas fueron generadas utilizando la técnica de transducción lentiviral con el plásmido pMD2.G (Addgene) y la construcción Bmal1-luc (Figura 2.1 A) y psPAX2 (Addgene) y la construcción Per2-luc (Figura 2.1 B). Los mismos contienen el promotor del gen reloj *bmal1* o *per2* dirigiendo la expresión de la proteína Luciferasa, con resistencia al antibiótico Ampicilina (Amp).

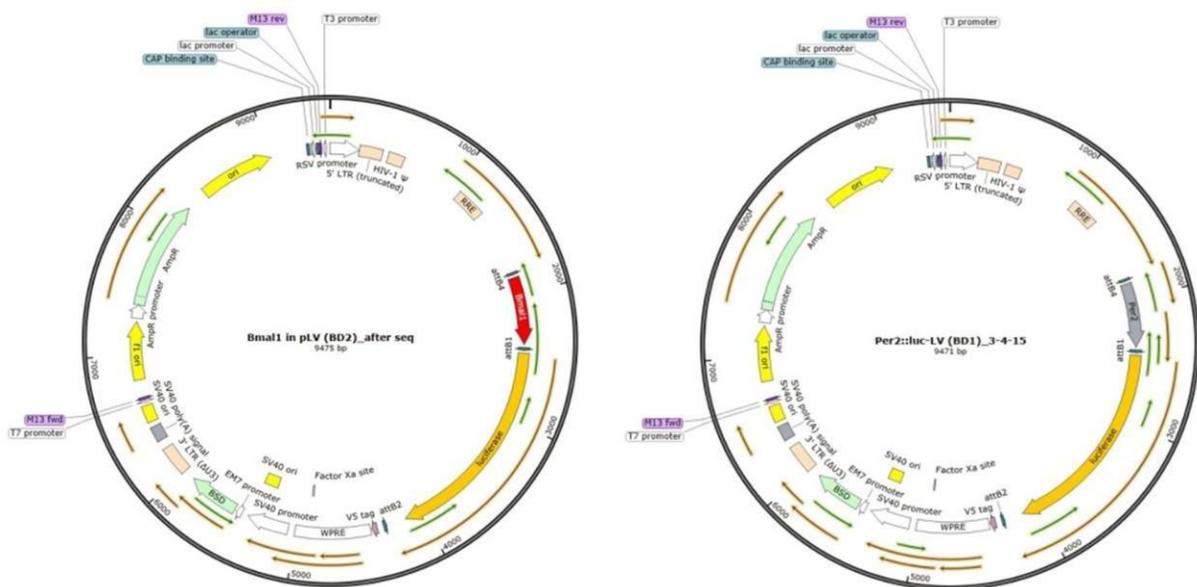


Figura 2.1. Mapas de los plásmidos utilizados para generar (A) el Vector lentiviral Bmal1-luc. En rojo se encuentra señalado el gen del promotor de *bmal1*, y en amarillo el gen que codifica la enzima luciferasa. (B) El vector lentiviral Per2-luc. En gris se encuentra señalado el gen del promotor de Per2, y en amarillo el gen de luciferasa.

1.1.3. Condiciones de cultivo celular

Todas las células utilizadas en esta tesis fueron conservadas en botellas de cultivo celular con medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Gibco, Thermo Fisher Scientific) con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), antibiótico-antimicótico (Atb, GIBCO) y 2mM de glutamina (Gln, GIBCO), en estufas con 5% de CO₂ a 37° C. Al llegar a confluencia, las células fueron repicadas sucesivamente, siguiendo los procedimientos estándar (ATCC). Las mismas fueron chequeadas para detectar la presencia de micoplasma dos veces al año, mediante tinción con DAPI (Sigma) y posterior observación en el microscopio (Russel, Newman y Williamson, 1975).

1.1.4 Sincronización circadiana de cultivos celulares

Para evaluar variables circadianas en un cultivo celular, es necesaria su previa sincronización para garantizar que todas las células se encuentren en la misma fase circadiana. Los métodos de sincronización son diversos, pero en la presente tesis se optó por el método descrito en (Balsalobre et al., 1998); el cual consiste en exponer a las células a un *shock* de suero (50% de SFB en DMEM) durante dos horas, seguido de un cambio de medio por DMEM completo. Posterior al shock de SFB, el tiempo transcurrido en horas se informa como horas post sincronización (HPS).

1.2. Registros bioluminiscentes *in vitro*

1.2.1 Plásmido pGL3-Bmal1-dLuc

El plásmido pGL3-Bmal1-dLuc (Figura 2.2) fue cordialmente brindado por el Dr. Erik Herzog de la Universidad de Washington en Saint Louis, EE. UU. El mismo contiene el promotor del gen reloj *bmal1* dirigiendo la expresión de la enzima Luciferasa, resistencia al antibiótico Ampicilina (Amp), y permite transfecciones transientes.

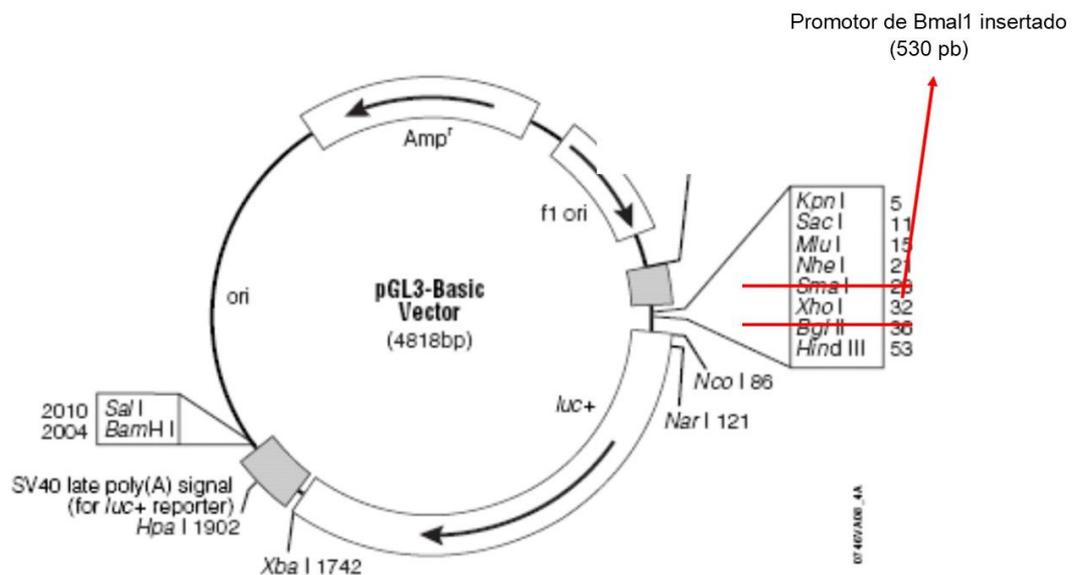


Figura 2.2. Mapa del plásmido pGL3-Bmal1-dLuc. En rojo se indica el sitio de inserción del promotor de *bmal1*, de 530 pb.

1.2.2. Transfección de células con pGL3-Bmal1-dLuc

Se sembraron 200.000 cel/*well* de LN229 o LN229E1 en una placa de 35 mm². Luego de 16 horas, se procedió a la transfección con Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU). Se adicionó 1 µg de plásmido, 2 µl de reactivo P3000 y 3 µl de Lipofectamina, en DMEM libre de SFB y antibiótico, dejando una placa sin transfectar como control.

1.2.3. Registro de ritmos de bioluminiscencia

Pasadas 6 h después de la transfección con el plásmido pGL3-Bmal1-dLuc, el medio fue reemplazado por DMEM completo con 50% SFB para llevar a cabo la sincronización de las células. Luego de 2 h de exposición al *shock* de suero, el medio fue reemplazado por medio adecuado para el mantenimiento de las células en el sistema de registro de bioluminiscencia, el cual contiene medio HEPES (Gibco, EE. UU) con 5% SFB, glutamina (2 mM), piruvato (2 mM) y luciferina (0.1 mM). Las placas fueron selladas con grasa siliconada para mantener la humedad y evitar la evaporación del medio de cultivo. Se registraron los ritmos celulares por medición de bioluminiscencia en el lector de luminiscencia Kronos Dio (ATTO). Dentro del equipo se mantuvo a las células a 37°C, sin inyección de CO₂. El equipo registró datos en tiempo real de cada *well* durante 6 minutos, con un intervalo de 30 minutos entre registros. Con esta frecuencia de muestreo, se obtuvieron series temporales de al menos 3 días.

1.3. Extracción de ARNm y síntesis de ADNc

Para analizar los ritmos circadianos del ARNm de los distintos genes mencionados en la tesis, tanto en LN229 como en LN229E1, se sembraron 8×10^5 células/*well* de LN229 o LN229E1 en placas de 6 *wells*, y las mismas fueron sincronizadas mediante shock de 50% SFB a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 HPS, es decir, en intervalos de 4 h cada 24 h. El ARN total se extrajo utilizando el *kit* EasyPure ARN (Transgen Biotech, China), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop1000 (Thermo Scientific, EE. UU) y la integridad del ARN fue chequeada realizando una electroforesis en gel de agarosa 1,2%. Posteriormente, se utilizaron 0,1 μ l de ADNasa I *free* ARNasa (Promega, EE. UU.) para eliminar el ADN de todas las muestras. A continuación, se sintetizó el ADNc a partir de 200 ng de ARN total utilizando la *Reverse transcriptase Superscript II* (Thermo Fisher Scientific, EE. UU) y oligonucleótidos OligodT.

1.4. PCR en tiempo real

Se realizó una reacción de PCR en tiempo real utilizando el equipo *Step One Real-Time PCR* (Applied Biosystems, EE. UU) y la mezcla de reacción *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, EE. UU). El ciclado utilizado fue el siguiente: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, y 1 minuto a 60°C.

1.5. In-cell westerns

Para evaluar los ritmos circadianos en las proteínas analizadas durante la tesis, se sembraron 3×10^3 células/*well* de LN229 o LN229E1 en placas de 96 *wells*, se sincronizaron mediante *shock* de 50% SFB en DMEM, y fueron fijadas con metanol frío (-20 °C) a 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, o 24 HPS, es decir, en intervalos de 3 h durante 24 h. Posteriormente, se llevó a cabo la técnica de *in-cell western* (McInerney *et al.*, 2017). Las células fueron lavadas tres veces durante 10 min con Buffer fosfato salino (PBS) 0,01 M, y se bloquearon con 5% de leche durante una hora. Se repitieron los tres lavados con PBS 0,01 M, y las células fueron tratadas con anticuerpos monoclonales primarios durante 16 h a 4 °C. A continuación, se realizaron nuevamente tres lavados con PBS 0,01 M, las células se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa 488 (Thermofisher Scientific, EE. UU) durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, fueron incubadas en 2 µg/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), y las cuantificaciones fluorescentes se llevaron a cabo en el equipo *Cytation 5 Imaging Reader* (Biotek Instruments, EE. UU), con los canales DAPI (360/460 nm) y proteína verde fluorescente (GFP, 480/520 nm) tanto para medir fluorescencia total, como para obtener imágenes utilizando objetivos de 10x.

1.6. Animales

1.6.1. Condiciones de mantenimiento

- Ratones en esquemas LO

En todos los experimentos se utilizaron ratones macho de dos meses de edad de la cepa *nude* NIH Swiss – foxN1(Δ/Δ). Para el caso de los experimentos realizados en Argentina, los ratones originalmente provienen de Laboratorios

Jackson (EE. UU.), pero los mismos fueron criados en el Bioterio de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP, Argentina). Para los experimentos realizados en EE. UU, tanto para los registros bioluminiscentes *in vivo* como los experimentos con Temozolomida (Capítulos I y III), se utilizaron ratones macho y hembra de la cepa *nude* NIH Swiss – foxN1(Δ/Δ) provenientes directamente de Laboratorios Jackson (EE.UU.). Para los experimentos realizados en Argentina, los animales se mantuvieron en el bioterio de la Universidad Nacional de Quilmes (Argentina), mientras que para los registros bioluminiscentes *in vivo* y los experimentos con Temozolomida, los mismos fueron mantenidos en el bioterio de la Universidad de Washington, Saint Louis, EE. UU, bajo ciclos de LO 12:12, a temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ\text{C}$). Debido a la inmunosupresión congénita de los ratones *nude*, se mantuvieron jaulas grupales de hasta 6 individuos en condiciones de esterilidad dentro de un *rack* aislador (Mazden Laboratories, EE. UU), que mantiene una presión positiva de aire bombeado a través de filtros tipo HEPA (FVL-900, Sabella, Argentina). Los ratones con registro de actividad locomotora en LO (Capítulo I) fueron mantenidos en jaulas individuales con ruedas registrando las revoluciones acumuladas cada un minuto, analizando posteriormente los datos en ClockLab (Actimetrics, versión 6.1.02). La actividad media (calculada a partir de los *onsets* de actividad diarios) fue calculada en ventanas de una semana: una semana antes del implante, una semana después del implante y luego cada semana hasta el final del estudio, para cada ratón. Si en una semana solo se visualizaron 4 días de registro o menos, el ratón fue excluido del análisis de dicha semana.

Todos los ratones fueron mantenidos con libre acceso a alimento balanceado (ACA Cooperación, Argentina) y agua autoclavados, y los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de

Laboratorio (CICUAL) de la UNQ, para los estudios realizados en Argentina; y las guías establecidas por el *Washington University Department of Comparative Medicine*, para los estudios realizados en EE.UU.

- Ratones en esquemas LO y en luz constante.

Los ratones *nude* se mantuvieron en el bioterio de la Universidad Nacional de Quilmes (Argentina) en jaulas individuales en armarios ventilados bajo un ciclo de LO 12:12, o bajo luz constante (LL), con una intensidad aproximada a 150 lux en la jaula. La actividad locomotora de los mismos fue registrada durante todo el protocolo mediante sensores de infrarrojo pasivos (PIR) colocados en la parte superior de la jaula y recolectando la cantidad de cuentas cada 5 minutos mediante el sistema de adquisición de datos Archron® versión 2.1, diseñado en nuestro Laboratorio. Los ratones fueron mantenidos con libre acceso a alimento balanceado (ACA Cooperación, Argentina) y agua autoclavados.

1.6.2. Implantación intracraneal (i.c) de células LN229 y LN229E1

El procedimiento de implantación de células de GBM en el estriado derecho del cerebro se realizó mediante cirugía estereotáxica en una cabina con flujo vertical de aire estéril. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de 2% isoflurano (Piramal) vaporizado en oxígeno (200-400 ml/min) mediante un equipo de anestesia gaseosa (Harvard Apparatus, EE.UU). Las células fueron levantadas y resuspendidas en medio DMEM sin SFB ni antibiótico. Se implantaron en cada ratón 2×10^5 cél/ μ l, a un flujo de 0,6 μ l/min, con una aguja de 33 ga montada a una microjeringa (Hamilton, EE.UU) en coordenadas respecto del punto craneal Bregma: ML (medio lateral) = -2; AP (anteroposterior) = 0; DV (dorso ventral) = -3, manteniendo la aguja dentro del cráneo 5 minutos posteriores a la implantación para

permitir el flujo correcto de la suspensión celular. Para los casos de ratones *sham* (control de operación), la cirugía fue llevada a cabo en las mismas condiciones, con la salvedad de que, en lugar de proceder a la implantación de células, la jeringa sin células fue introducida en el cerebro y mantenida durante 5 minutos.

Las herramientas de cirugía fueron esterilizadas con etanol al 70% y exposición a radiación UV germicida. Durante toda la operación se desinfectaron tanto los materiales como los tejidos con solución yodada. Se cerró la herida con sutura mediante cianocrilato (La gotita). Luego de la cirugía, los animales permanecieron en recuperación en jaulas grupales en condiciones de LO 12:12 durante 5 días, bajo tratamiento con Ampicilina 6 mg/kg por vía subcutánea e ibuprofeno (Northia) 0,05 mg/ml en el agua de bebida. Para todos los experimentos, se realizó un seguimiento del peso y de parámetros comportamentales durante todo el protocolo.

1.6.3. Perfusiones

Los animales fueron anestesiados profundamente mediante sobredosis de 5% isoflurano (Piramal) vaporizado en 400 ml/min de oxígeno. Una vez observada la pérdida del reflejo podal y la depresión cardiorespiratoria, los animales se sujetaron a una superficie de disección mantenidos bajo isoflurano, y se realizó una incisión longitudinal en la pared abdominal, cortando luego el diafragma para tener acceso a la cavidad torácica. Se colocó una aguja de 30-ga en el ventrículo izquierdo del corazón, y se realizó una pequeña incisión en la aurícula derecha. En primer lugar, los ratones fueron perfundidos intra-cardíacamente con 30 ml de (PBS) 0,01M, pH 7,4, y luego con 50 ml de fijador (paraformaldehído 4%, pH 7,4). Una vez que se confirmó el proceso de fijación (rigidez del cuerpo del animal), se procedió a

remover los cerebros, que fueron post-fijados por 24 horas en la solución de fijador a 4°C. A continuación, los cerebros se sumergieron en soluciones crioprotectoras seriadas: PBS 0,01M, 10% sacarosa por 24-48 hs, PBS 0,01M, 20% sacarosa por 24-48 hs, PBS 0,01M, 30% sacarosa por 24-48 hs seguido de una nueva inmersión en PBS 0,01M, 30% sacarosa por 24-48 hs adicionales. Luego, fueron conservados a -80°C hasta su procesamiento.

1.6.4. Procesamiento de los cerebros para tinción

Se realizaron cortes coronales de 35 µm de los cerebros en un criostato (CM 1850 Leica Biosystems, EE. UU.) a -18 C. Se descartaron todos los cortes obtenidos de la zona del bulbo olfatorio de los cerebros y se guardaron los correspondientes al núcleo estriado desde la región de implantación del tumor (bregma=0) hasta la desaparición de este, la cual fue observada por microscopia de campo claro.

1.6.5. Tinción de Nissl

Los cortes cerebrales obtenidos fueron adheridos a vidrios portaobjetos cargados positivamente y, posteriormente, teñidos con una solución de Cresyl violeta 0,5% en buffer acetato para observar los tumores. Se realizó un lavado rápido en etanol 70% y posteriormente en etanol 50%. Luego se incubó con la solución de Cresyl violeta 0,5% durante 15 minutos y se procedió a deshidratar los cortes realizando un lavado rápido en etanol 96%. Por último, luego de secar los vidrios se cubrieron con Bálsamo de Canadá Sintético (Biopack) y un vidrio cubreobjetos. Se obtuvieron imágenes de los cortes con el equipo Cytation 5, utilizando el filtro de campo claro color con un aumento de 2,5 x.

1.6.6. Inmunohistoquímicas.

Las inmunohistoquímicas para evaluar las distintas proteínas a lo largo de la tesis fueron realizadas utilizando la técnica de inmunotinción flotante de cerebros. Primeramente, los cerebros fueron lavados con una solución salina tampón de fosfato con Tritón X-100 (PBS-T) al 0,03% y PBS-T al 0,3%, se bloquearon con leche al 10% y se trataron con el correspondiente anticuerpo primario y se incubaron durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, los cortes se lavaron con PBS-T al 0,03% y PBS-T al 0,3%, y se trataron con anticuerpos secundarios. Los cortes se colocaron en vidrios portaobjetos, se secaron al aire durante la noche, se cubrieron con medio de montaje DAPI (Southern Biotech, EE. UU.) y se cubrieron con vidrio. Las mediciones fluorescentes se realizaron con el lector de imágenes Cytation 5 (Biotek Instruments, EE. UU) y objetivos de 2,5x y 10x en los canales correspondientes.

1.7. Análisis de los resultados

Las distribuciones normales de las subpoblaciones de datos fueron analizadas con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilkinson, y la homocedacia fue analizada con la prueba de Bartlett. Se realizaron pruebas paramétricas (pruebas t de Student, ANOVA de una vía, de dos vías o de tres vías según se indica en el texto de cada Capítulo) y pruebas *post hoc* (comparaciones múltiples de Tukey y prueba de Sidak) o análisis no paramétricos según corresponda. Los resultados se presentan como media \pm EEM de los conjuntos de datos experimentales, o como datos individuales, dependiendo del caso. Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla California, EE. UU).

La probabilidad de cometer error de tipo I para los contrastes de hipótesis fue definida en $p=0.05$, siendo estadísticamente significativos aquellos con estadísticos

iguales o inferiores a los de tabla, correspondientes con este valor definiendo la zona de rechazo de la hipótesis nula.

Se utilizaron modelos de coseno para probar si las variables eran rítmicas o no, cuando corresponde. La presencia de ritmos circadianos se evaluó utilizando el análisis de COSINOR, el periodograma de Lomb-Scargle (LS) y JTK_CYCLE (JTK), los cuales realizan ajustes por mínimos cuadrados del residual a funciones coseno con un período de 24 h, y amplitud de prueba = 0 como hipótesis nula). El análisis COSINOR se realizó con el paquete El Temps (Díez-Noguera, 2013) y la función Meta2d (para ejecutar LS y JTK) se ejecutó con el paquete Metacycle R (Wu *et al.*, 2016).

Bibliografía General

Abdraboh ME, *et al* (2022) 'Constant light exposure and/or pinealectomy increases susceptibility to trichloroethylene-induced hepatotoxicity and liver cancer in male mice'. *Environ Sci Pollut Res Int.* 29(40):60371-60384. doi: 10.1007/s11356-022-19976-4.

Aiello I, *et al.* (2021) 'Circadian disruption induced by tumor development in a murine model of melanoma.' *Chronobiol Int.* 39(1):12-25. doi: 10.1080/07420528.2021.1964519.

Al-Naimi S., S. M. Hampton, P. Richard, C. Tzung, L. M. Morgan (2004) 'Postprandial metabolic profiles following meals and snacks eaten during simulated night and day shift work'. *Chronobiol Int.* 21(6): 937-947.

Araque, A., *et al.* (1998) 'Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons'. *Europ. Journal of Neurosci.* 10(6): p. 2129-42.

Araque, A; Navarrete, M. (2010) 'Glial cells in neuronal network function'. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365(1551): p. 2375-81.

Aschoff, J. (1960). 'Exogenous and endogenous components in circadian rhythms.' *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 25:11-28. doi: 10.1101/sqb.1960.025.01.004.

Aschoff, J. (1979) 'Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions.' *Z. Tierpsychol.* 49, 225–249

Balsalobre, A., Damiola, F. and Schibler, U. (1998) 'A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells', *Cell*. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81199-X.

Burton, R (1621). 'Anatomía de la melancolía'. Colección Austral. Impreso en Argentina, 1947.

Cardozo Olivera, JM et al. (2010) 'Estudio de una cohorte de pacientes adultos con tumores primarios del sistema nervioso central de la serie glial'. *ELSEVIER*. 2(4): p. 240-24

Castañeda, C. (2015) 'Glioblastoma: Molecular analysis and its clinical implications'. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*.

Chen ST, (2005). 'Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers'. *Carcinogenesis*.

Chun, S.K., et al. (2015). 'A synthetic cryptochrome inhibitor induces anti-proliferative effects and increases chemosensitivity in human breast cancer cells'. *Biochem Biophys Res Commun*. 467(2): p. 441-6.

Cui K, et al. (2021). 'Hub biomarkers for the diagnosis and treatment of glioblastoma based on microarray technology'. *Technol Cancer Res Treat*. Dec;20:1533033821990368. doi: 10.1177/1533033821990368.

Cuninkova, L.; S.A. Brown. (2008) 'Peripheral circadian oscillators: interesting mechanisms and powerful tools'. *Ann N Y Acad Sci*. 1129: p. 358-70.

De Mairan, JJO (1729) 'Observation Botanique. Histoire de l'Academie Royale des Sciences', Paris.

Denny, B.J., *et al.* (1994) 'NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA.' *Biochemistry*. 33(31): p. 9045-51.

Díez-Noguera A. (2013). 'Methods for serial analysis of long time series in the study of biological rhythms'. *Journal of Circadian Rhythms*. doi: 10.1186/1740-3391-11-7.

Emery P, Klarsfeld A, Stanewsky R, Shafer OT (2023). 'Sensitive Timing: A Reappraisal of Chronobiology's Foundational Texts'. *J Biol Rhythms*. Jun;38(3):245-258. doi: 10.1177/07487304231169080.

Farshadi E, *et al* (2019) 'The positive circadian regulators CLOCK and BMAL1 control G2/M cell cycle transition through Cyclin B1'. *Cell Cycle*.

FDA (2009). 'FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab (Avastin®) as Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme'. *The Oncologist*.

Filipski, E., *et al.*, (2004) 'Effects of chronic jet lag on tumor progression in mice'. *Cancer Res*. 64(21): p. 7879-85.

Fu XJ, *et al.* (2016). 'The important tumor suppressor role of PER1 in regulating the cyclin–CDK–CKI network in SCC15 human oral squamous cell carcinoma cells'. *Onco Targets Ther*.

Fujioka A, Takashima N, Shigeyoshi Y (2006). 'Circadian rhythm generation in a glioma cell line'. *Biochem Biophys Res Commun.* 346(1):169-74. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.05.094.

Fukushima, T., H. Takeshima, H. Kataoka (2009) 'Anti-glioma therapy with temozolomide and status of the DNA-repair gene MGMT'. *Anticancer Res*, 29(11): p. 4845-54.

Gery S, *et al.* (2005) 'Transcription profiling of C/EBP targets identifies Per2 as a gene implicated in myeloid leukemia'. *Blood*, 106: p. 2827-2835.

Gery, S., *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(3): p. 375-82.

Golombek, D. (2003) 'CRONOBIOLOGÍA: LA MÁQUINA DEL TIEMPO'. Ed. UNQ.

Golombek, D. A. and Rosenstein, R. E. (2010) 'Physiology of circadian entrainment', *Physiological Reviews*. doi: 10.1152/physrev.00009.2009.

Gotoh T, *et al.* (2014). 'The circadian factor Period 2 modulates p53 stability and transcriptional activity in unstressed cells'. *Mol Biol Cell*.

Gréchez-Cassiau A, *et al.* (2008) 'The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21 WAF1/ CIP1 expression and hepatocyte proliferation'. *J Biol Chem*.

Güler AD, et al.(2008). 'Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision'. *Nature*. 453(7191):102-5. doi: 10.1038/nature06829.

Gutierrez-Monreal, M.A., et al. (2016) 'Identification of circadian-related gene expression profiles in entrained breast cancer cell lines'. *Chronobiol Int*. 33(4): p. 392-405.

Gwon DH, et al. (2020) '*BMAL1* Suppresses Proliferation, Migration, and Invasion of U87MG Cells by Downregulating Cyclin B1, Phospho-AKT, and Metalloproteinase-9'. *Int J Mol Sci*.21(7):2352. doi: 10.3390/ijms21072352.

Halberg F, (2003) 'Transdisciplinary unifying implications of circadian findings in the 1950s.' *J Circadian Rhythms*. 1(1):2. doi: 10.1186/1740-3391-1-2.

Hartley, D.M., et al. (1993) 'Glutamate receptor-induced 45Ca^{2+} accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration'. *J Neurosci*, 13(5): p. 1993-2000.

Hastings MH, Maywood ES, Brancaccio M (2018). 'Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus'. *Nat Rev Neurosci*. 19(8):453-469. doi: 10.1038/s41583-018-0026-z.

Hattar S, et al. (2006). 'Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse'. *J Comp Neurol*. 497(3):326-49. doi: 10.1002/cne.20970.

Hsu CM (2012). 'Altered expression of circadian clock genes in head and neck squamous cell carcinoma'. *Tumor Biol*.

Johnson DR, *et al.* (2018). 'Overall survival in patients with glioblastoma before and after bevacizumab approval'. *Curr Med Res Opin.* May;34(5):813-820. doi: 10.1080/03007995.2017.1392294.

Jung CH, *et al.* (2013) 'Bmal1 suppresses cancer cell invasion by blocking the phosphoinositide 3-kinase-Akt-MMP-2 signaling pathway'. *Oncol Rep.* 29(6):2109-13. doi: 10.3892/or.2013.2381.

Jung, CH *et al.* (2013) 'Bmal1 suppresses cancer cell invasion by blocking the phosphoinositide 3-kinase-Akt-MMP-2 signaling pathway'. *Oncol Rep.* 29(6):2109-13. doi: 10.3892/or.2013.2381.

Kamagata, M. *et al.* (2017) 'Potent synchronization of peripheral circadian clocks by glucocorticoid injections in PER2::LUC-Clock/Clock mice', *Chronobiology International.* doi: 10.1080/07420528.2017.1338716.

Karlsson B. H., A. K. Knutsson, B. O. Lindahl, L. S. Alfredsson (2003). 'Metabolic disturbances in male workers with rotating three-shift work. Results of the WOLF study'. *Int Arch Occup Environ Health.* 76(6): 424-430.

Karlsson B., A. Knutsson, B. Lindahl (2001) 'Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people'. *Occup Environ Med.* 58(11): 747-752.

Katamune C, *et al.* (2016). 'Different Roles of Negative and Positive Components of the Circadian Clock in Oncogene-induced Neoplastic Transformation'. *J Biol Chem.*;291(20):10541-50. doi: 10.1074/jbc.M115.706481.

Kettenmann, H. *et al.*, (2011). 'Physiology of Microglia'. *Physiological Reviews*, pp.461– 553.

Khan S, Xue M, Yong VW (2021). 'Does chronic jet lag increase risk of cancer?' *Aging (Albany NY)*. 13(18):21810-21811. doi: 10.18632/aging.203596.

Lehre, K.P., *et al.* (1995). 'Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations'. *J Neurosci*. 15(3 Pt 1): p. 1835-53.

Li, T.; J.Y. Chiang (2014) 'Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy'. *Pharmacol Rev*, 2014. 66(4): p. 948-83.

Lowrey, P. L. and Takahashi, J. S. (2004) 'MAMMALIAN CIRCADIAN BIOLOGY: Elucidating Genome-Wide Levels of Temporal Organization', *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. doi: 10.1146/annurev.genom.5.061903.175925.

Marchant EG, Watson NV, Mistlberger RE. (1997). 'Both neuropeptide Y and serotonin are necessary for entrainment of circadian rhythms in mice by daily treadmill running schedules'. *J Neurosci*. 17(20):7974-87. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-20-07974.1997.

Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H (2003). Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* (80-).

Mavroudis, P.D., *et al.*, (2012) 'Entrainment of peripheral clock genes by cortisol'. *Physiol Genomics*. 44(11): p. 607-21

McInerney MP, Pan Y, Short JL, Nicolazzo JA (2017). 'Development and Validation of an In-Cell Western for Quantifying P-Glycoprotein Expression in Human Brain Microvascular Endothelial (hCMEC/D3) Cells'. *J Pharm Sci.* doi: 10.1016/j.xphs.2016.12.017.

Meyer-Bernstein EL, Morin LP. (1996) 'Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation'. *J Neurosci.* 16(6):2097-111. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-06-02097.1996.

Motohashi, H. *et al.* (2017) 'Polyporus and Bupleuri radix effectively alter peripheral circadian clock phase acutely in male mice', *Nutrition Research.* doi: 10.1016/j.nutres.2017.05.001.

Mullenders J, *et al.* (2009). 'A large scale shRNA barcode screen identifies the circadian clock component ARNTL as putative regulator of the p53 tumor suppressor pathway'. *PLoS One.* 4(3):e4798. doi: 10.1371/journal.pone.0004798.

Murphy, T.H., R.L. Schnaar, J.T. Coyle (1990) 'Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake'. *FASEB J.* 4(6): p. 1624-33.

Nagoshi, E., *et al.* (2005) 'Circadian gene expression in cultured cells'. *Methods Enzymol*, 393: p. 543-57.

Ogunrinu, T.A.; H. Sontheimer (2010) 'Hypoxia increases the dependence of glioma cells on glutathione'. *J Biol Chem.* 285(48): p. 37716-24.

Ohba, S.; Hirose, Y. (2016) 'Current and Future Drug Treatments for Glioblastomas'. *Curr Med Chem.* 23(38): p. 4309-4316.

Omuro, A. and DeAngelis, L. M. (2013) 'Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review', *JAMA - Journal of the American Medical Association.* doi: 10.1001/jama.2013.280319.

OMS. Cancer Today. (2021) 'Argentina. Globocan'.
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/32-argentina-fact-sheets>

Peter R., *et al* (1999) 'Does a stressful psychosocial work environment mediate the effects of shift work on cardiovascular risk factors?' *Scand J Work Environ Health.* 25(4): 376-381.

Phillips, H. S. *et al.* (2006) 'Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis', *Cancer Cell.* doi: 10.1016/j.ccr.2006.02.019.

Pittendrigh, C.S, Daan, S. (1976). 'A Functional Analysis of Circadian Pacemakers in Nocturnal Rodents. IV. Entrainment: Pacemaker as Clock'. *Journal of Comparative Physiology A*, 106(3), 291-331. <https://doi.org/10.1007/BF01417856>

Pittendrigh, CS. (1960). 'Circadian rhythms and the circadian organization of living systems'. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*25:159-84. doi: 10.1101/sqb.1960.025.01.015.

Preitner, N. *et al.* (2002) 'The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator', *Cell*. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00825-5.

Preman P, *et al.* (2021) 'Astrocytes in Alzheimer's Disease: Pathological Significance and Molecular Pathways'. *Cells*. 10(3):540. doi: 10.3390/cells10030540.

Prolo, L.M., J.S. Takahashi, and E.D. Herzog (2005) 'Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes'. *J Neurosci*, 25(2): p. 404-8.

Qu M, *et al.* (2023) 'Circadian regulator BMAL1::CLOCK promotes cell proliferation in hepatocellular carcinoma by controlling apoptosis and cell cycle'. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 120(2):e2214829120. doi: 10.1073/pnas.2214829120.

Reebs, S.G, Mrosovsky, N. (1989) 'Effects of induced wheel running on the circadian activity rhythms of Syrian hamsters: entrainment and phase response curve'. *J Biol Rhythms*. 4:39–48.

Richardson, W.D. *et al.* (2011). 'Review NG2-glia as Multipotent Neural Stem Cells : Fact or Fantasy ?' *Neuron*, 70(4), pp.661–673.

Robert, S.M., H. Sontheimer (2014) 'Glutamate transporters in the biology of malignant gliomas'. *Cell Mol Life Sci*. 71(10): p. 1839-54.

Salud, O.M.d.I., Clasificación de los Tumores del SNC, 2007.

Sato, T. K. *et al.* (2004) 'A functional genomics strategy reveals rora as a component of the mammalian circadian clock', *Neuron*. doi: 10.1016/j.neuron.2004.07.018.

Schernhammer E. S., *et al.* (2003) 'Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study'. *J Natl Cancer Inst.* 95(11): 825-828.

Schibler, U. *et al.* (2016) 'Clock-Talk: Interactions between central and peripheral circadian oscillators in mammals', in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. doi: 10.1101/sqb.2015.80.027490.

Singh K, *et al.* (2021) 'Enhancing T Cell Chemotaxis and Infiltration in Glioblastoma.' *Cancers (Basel)*. 13(21):5367. doi: 10.3390/cancers13215367.

Singh K, *et al.* (2022) 'Designing Clinical Trials for Combination Immunotherapy: A Framework for Glioblastoma'. *Clin Cancer Res.* 28(4):585-593. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-2681.

Sinning, M (2017) 'BRAIN TUMOR CLASSIFICATION'. *Revista Médica Clínica Las Condes*.

Slat, E.A., *et al.* (2017), 'Cell-intrinsic, Bmal1-dependent Circadian Regulation of Temozolomide Sensitivity in Glioblastoma'. *J Biol Rhythms.* 32(2): p. 121-129.

Somjen GG. (1988) 'Nervenkitt: notes on the history of the concept of neuroglia'. *Glia.* 1(1):2-9. doi: 10.1002/glia.440010103. PMID: 2976736.

Soomro, S. H. *et al.* (2017) 'Molecular biology of glioblastoma: Classification and mutational locations', *Journal of the Pakistan Medical Association*.

Stevens, R. G. (2005) 'Circadian disruption and breast cancer: from melatonin to clock genes'. *Epidemiology.* 16(2): 254-258.

Stupp, R. *et al.* (2005) 'Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.', *The New England journal of medicine*. doi: 10.1056/NEJMoa043330.

Takahashi JS (2015). 'Molecular components of the circadian clock in mammals'. *Diabetes Obes Metab*. 17 Suppl 1(0 1):6-11. doi: 10.1111/dom.12514.

Takahashi, J.S., *et al.* (2008). 'The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease'. *Nat Rev Genet*. 9(10): p. 764-75

Tesoriero, C; Xu, YZ; Mumba, ND; Bentivoglio, M. (2018) 'Neural Damage in Experimental *Trypanosoma brucei gambiense* Infection: The Suprachiasmatic Nucleus'. *Front Neuroanat*. 12:6. doi: 10.3389/fnana.2018.00006.

Trebucq, Laura L, Marpegan, Luciano, Golombek, Diego A., Chiesa, Juan J. (2020) 'What, how and (especially) when: chronopharmacological approach in cancer therapies.' *Sleep Science*.

Trotter, J., Karram, K. y Nishiyama, A. (2010). 'NG2 cells: Properties, progeny and origin'. *Brain research reviews*, 63(1-2), pp.72–82.

Verhaak RG. (2010). 'Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1'. *Cancer Cell*. 17(1):98-110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.

von Bartheld CS et al. (2016) 'The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting'. *J Comp Neurol.* 15;524(18):3865-3895. doi: 10.1002/cne.24040.

Wagle N, et al. (2020) 'Characterization of molecular pathways for targeting therapy in glioblastoma'. *Chin Clin Oncol.* 9(6):77. doi: 10.21037/cco-20-124.

Wagner P. M., et al. (2018). 'Proliferative glioblastoma cancer cells exhibit persisting temporal control of metabolism and display differential temporal drug susceptibility in chemotherapy'. *Mol Neurobiol*, 56(2), 1276–1292. doi:10.1007/s12035-018-1152-3

Wang C. et al. (2021) 'Astrocyte dysfunction in Parkinson's disease: from the perspectives of transmitted α -synuclein and genetic modulation'. *Transl Neurodegener.* 10(1):39. doi: 10.1186/s40035-021-00265-y.

Wams, E. J., et al. (2017). 'Mechanisms of Non-photoc Entrainment. Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour', 395–404. doi:10.1007/978-81-322-3688-7_18

Wang J, (2019). 'Circadian protein BMAL1 promotes breast cancer cell invasion and metastasis by up-regulating matrix metalloproteinase9 expression'. *Cancer Cell Int.* 19:182. doi: 10.1186/s12935-019-0902-2.

Watkins, S., H. Sontheimer (20142). 'Unique biology of gliomas: challenges and opportunities'. *Trends Neurosci.* 35(9): p. 546-56.

Welsh, D. K. *et al.* (2004) 'Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2004.11.057.

Westphal, M. and Lamszus, K. (2011) 'The neurobiology of gliomas: From cell biology to the development of therapeutic approaches', *Nature Reviews Neuroscience*. doi: 10.1038/nrn3060.

Wolff, A.L.a.J., (2012) 'HIGH GRADE GLIOMAS'. *Neuro Oncol*, 14(1): p. i56–i68.

Wolff, G., Duncan, M.J, Esser, K.A (2013). 'Chronic phase advance alters circadian physiological rhythms and peripheral molecular clocks'. *J Appl Physiol*. 115(3): p. 373-82.

Wu G, *et al.* (2016). 'MetaCycle: An integrated R package to evaluate periodicity in large scale data'. *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/btw405.

Yan L, *et al.* (2007) 'Exploring spatiotemporal organization of SCN circuits'. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 72:527-41. doi: 10.1101/sqb.2007.72.037.

Yoo, S.H., *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(15): p. 5339-46.

Zhang Y, *et al.* (2018) 'Dosing time dependent in vitro pharmacodynamics of Everolimus despite a defective circadian clock'. *Cell Cycle*.

Zhang Y,(2021). 'BMAL1 Knockdown Leans Epithelial-Mesenchymal Balance toward Epithelial Properties and Decreases the Chemoresistance of Colon Carcinoma Cells'. *Int J Mol Sci.* 22(10):5247. doi: 10.3390/ijms22105247.

Zhao C, (2022) 'Circadian clock gene *BMAL1* inhibits the proliferation and tumor-formation ability of nasopharyngeal carcinoma cells and increases the sensitivity of radiotherapy.' *Chronobiol Int.* 39(10):1340-1351. doi: 10.1080/07420528.2022.2105708.

Zhao H, *et al.* (2014). 'Prognostic relevance of Period1 (Per1) and Period2 (Per2) expression in human gastric cancer'. *Int J Clin Exp Pathol.*

Zschocke, J., *et al.* (2007). 'DNA methylation dependent silencing of the human glutamate transporter EAAT2 gene in glial cells'. *Glia.* 55(7): p. 663-74.

Capítulo I.

Rol del reloj circadiano en la proliferación y prognosis del glioblastoma

1.Introducción

1.1. Modelos de arritmicidad celular para el estudio de la interacción entre los ritmos circadianos y el cáncer.

Como se mencionó en la “Introducción General” (sección “El reloj molecular en las células tumorales”) una forma muy común de estudiar el rol que los genes reloj poseen en la proliferación y prognosis del cáncer es mediante el silenciamiento o sobreexpresión de estos genes, siendo las estrategias más comúnmente utilizadas los ARN de interferencia pequeños (siARN), los ARN *hairpin* pequeños (shARN) (Rao *et al.*, 2009) y la tecnología CRISPR/Cas9 (Singh *et al.*, 2017), la cual permite editar de forma directa y estable el genoma.

Por ejemplo, se demostró que la deficiencia de *per2* aumenta la incidencia de tumores generados por irradiación (Fu *et al.*, 2002) y acelera la progresión del cáncer de pulmón en ratones *nude* (Papagiannakopoulos *et al.*, 2016). Por otro lado, Yaping *et al.* (2017) mostraron que el gen *clock* se encuentra más expresado en las células de cáncer colorrectal SW480, y que cuando se sobreexpresa, aumenta la migración, lo que sugiere que esta proteína regula dicho proceso en este tipo de células tumorales. La sobreexpresión de Clock también aumentó la expresión de genes relacionados con la angiogénesis tumoral, como HIF-1a y VEGF, lo que contribuyó a la malignidad del tumor.

Por lo tanto, estas estrategias han permitido establecer conexiones entre los genes reloj y la tumorigénesis, colaborando en el entendimiento de la interacción que existe entre el reloj molecular y el cáncer. Sin embargo, silenciar o sobreexpresar un único gen reloj muchas veces no genera un modelo de arritmicidad en las células, sino que da información sobre el rol de ese gen reloj puntual en el proceso, el cual, en algunos casos, se encuentra relacionado con su

rol en el ciclo celular. En ese sentido, *bmal1* es el único gen reloj que al ser deletado produce arritmicidad tanto *in vitro* como *in vivo*, a nivel del reloj central y en tejidos periféricos, dado que se inhibe además a *bmal2*, su homólogo compensador (Shi *et al.*, 2010). Por esta razón, *bmal1* se ha definido como el único componente esencial del reloj circadiano molecular en los mamíferos (Bunger *et al.*, 2000; Baggs *et al.*, 2009), y es por esto que su manipulación constituye un modelo tan interesante para estudiar el rol del reloj circadiano en la progresión tumoral. En diversos estudios *in vivo* e *in vitro*, se ha demostrado que el silenciamiento de *bmal1* condujo a una menor expresión en *per1* y *per2* (Mieda *et al.*, 2015; Mieda *et al.*, 2017; Trebucq *et al.*, 2021). A su vez, se ha observado que ratones *Bmal1*-KO presentan arritmicidad a nivel comportamental y en la expresión de los genes controlados por el reloj (Bunger *et al.*, 2005). Este experimento también fue llevado adelante en monos, transfiriendo el núcleo de fibroblastos *Bmal1*-KO en cigotos de macacos. Los individuos que sobrevivieron y llegaron a término, mostraron arritmicidad en sus patrones de actividad, al igual que en la expresión de diversos genes controlados por el reloj que regulan funciones endocrinas, como cortisol, melatonina y testosterona (Qiu *et al.*, 2019).

En ese sentido, el silenciamiento de *bmal1* en un modelo de cáncer de mama celular aumentó la apoptosis celular frente al tratamiento con cisplatino, un quimioterápico comúnmente utilizado en este tipo de tumores (Korkmaz *et al.*, 2018), mientras que la pérdida específica de *bmal1* en hepatocitos favoreció la formación de un carcinoma hepatocelular espontáneo (Kettner *et al.*, 2016). Estos resultados coinciden con la idea de que *bmal1*, y la consecuente eliminación de los ritmos circadianos celulares tumorales, puede actuar en algunos tipos de cáncer como

supresor de tumores, mientras que en otros colabora en mantener el crecimiento y la proliferación tumoral.

Existen otras estrategias para generar arritmicidad en células y de esta manera poder estudiar el reloj molecular. Una de ellas es no sincronizar a los cultivos con SFB o dexametasona, para de esta forma no brindarles ninguna clave temporal, y observar diferencias en sus procesos celulares en función de si se encuentran sincronizados o no. Esta estrategia fue utilizada por Kiessling *et al.* (2017), quienes encontraron que las células de carcinoma de piel murino B16 exhiben una oscilación atenuada de los genes del reloj, pero al tratarlas con dexametasona o forskolina, se restauran dichos ritmos, lo que resultó en menos células en la fase S y más en la fase G1.

Otra estrategia comúnmente utilizada para modular la actividad del reloj molecular es la utilización de fármacos que bloqueen (antagonistas) o aumenten (agonistas) la acción de sus componentes. El más comúnmente utilizado es SR9009, un agonista de Rev-erb, el cual se une a sus receptores produciendo un efecto similar (por ejemplo, inhibición de *bmal1*). Se ha demostrado que el tratamiento con dicho agonista inhibe la proliferación tumoral del GBM y mejora la supervivencia en ratones (Wagner *et al.*, 2019; Sulli *et al.*, 2018). Otro ejemplo es la nobiletina, un agonista de Ror- α (es decir, potencia el efecto activador de Ror- α sobre *bmal1*), el cual se demostró que inhibe la proliferación tumoral en un modelo de cáncer de piel (Murakami *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta lo antes expuesto, utilizando la tecnología CRISPR/Cas9 en células LN229 de GBM humano, en el presente capítulo se llevó a cabo un silenciamiento parcial del gen *bmal1*, para estudiar su rol en el funcionamiento del

reloj circadiano en estas células, y cómo la ausencia de este control impacta en la proliferación celular, prognosis y progresión del tumor *in vivo* en ratones *nude*.

1.2. La luz constante como modelo de disrupción circadiana para estudiar la progresión del cáncer.

La luz constante ha sido utilizada ampliamente como modelo de disrupción circadiana desde los inicios de la cronobiología. Al exponer a roedores nocturnos a ese tipo de esquema lumínico, se han observado típicamente dos fenotipos: alargamientos en el periodo (Maroni *et al.*, 2018; Rumanova *et al.*, 2020), y con un mayor tiempo de exposición, arritmicidad (Fonken *et al.*, 2010; Gale *et al.*, 2012). Se ha demostrado a su vez que la luz constante genera una desincronización o desacople entre los osciladores neuronales de los NSQ, lo cual provoca una desincronización en los osciladores en órganos periféricos (Ohta *et al.*, 2005).

El ser humano es esencialmente diurno. En las últimas décadas, la vida moderna y la luz artificial nos ha llevado a vivir en condiciones donde nos encontramos expuestos a luz en momentos de la noche, ya sea por el hecho de vivir en ciudades, donde las personas se exponen a intensidades lumínicas hasta 100 veces mayores que los 0,3 luxes de la luz lunar (Rich y Longcore, 2005, Kyba *et al.*, 2017), o por la exposición constante a pantallas (Chinoy *et al.*, 2018). La exposición nocturna sistemática a la luz (lo que se conoce como contaminación lumínica) tiene efectos importantes sobre la fase del reloj central hipotalámico y sobre sus salidas, generando una desincronización interna de los osciladores periféricos con consecuencias en la salud. En ratones y ratas, se ha demostrado que produce un fenotipo diabético (Gale *et al.*; 2011, Qian *et al.*, 2015), fenotipo del tipo depresivo (Tchekalarova *et al.*, 2018) y síndrome metabólico (Mustonen *et al.*, 2002), mientras que en seres humanos produce enfermedades como obesidad (Dang *et al.*, 2023)

o desincronización del ritmo de sueño/vigilia (Vetter *et al.*, 2011), entre otras alteraciones de la fisiología normal. Entre las enfermedades que los esquemas de desincronización circadiana provocan, puede mencionarse también el cáncer. Ya ha sido demostrado que el trabajo en turnos rotativos y el jet-lag crónico promueven la incidencia de diversos tipos de cáncer, tanto en seres humanos (Heckman *et al.*, 2017; Arafa *et al.*, 2021) como en modelos animales (Aiello *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2019). A su vez, se ha demostrado que la luz constante promueve la generación de cáncer de hígado (Abdraboh *et al.*, 2022) y de mama en ratones (Anisimov *et al.*, 2012), existiendo sólo un estudio en glioblastoma heterotópico en ratas (Guerrero Vargas *et al.*, 2017). Por lo tanto, es importante seguir profundizando estos estudios con protocolos de luz constante, que pueden modelar la contaminación lumínica nocturna. En ese sentido, exponer a los animales a ciclos de 24 h con luz tenue durante la noche, es un mejor modelo cuando se quiere estudiar este tipo de contaminación lumínica.

A su vez, es importante destacar que la exposición a la luz durante la noche es un factor fundamental a tener en cuenta en las terapias intensivas. Se ha demostrado que dicha exposición afecta la calidad de sueño de los pacientes (Bernat *et al.*, 2021) así como también la expresión rítmica de los genes reloj *bmal1*, *per1* y *clock* cuando los mismos son analizados en muestras de pacientes luego de una semana en terapia intensiva (Díaz *et al.*, 2019). La mayoría de los pacientes que se encuentran en este tipo de terapias (entre los cuales están presentes los pacientes con cáncer avanzado), están expuestos a luces durante la noche ya que las visitas médicas ocurren en diversos momentos por la dinámica propia de los hospitales y la organización en turnos rotativos de los médicos y enfermeros (Morag y Ohlsson, 2016). Por lo tanto, estos pacientes que se encuentran en un espacio

donde se está buscando su mejora, muchas veces se ven sucesivamente expuestos a luz durante la noche, lo cual lejos de colaborar en su recuperación, puede empeorar la situación. Hay evidencias de que exponer a los pacientes a un ciclo LO robusto colabora en su mejora, como demuestran diversos estudios realizados en pacientes neonatos internados en cuidados intensivos, donde luego de cambiar la luz constante por ciclos LO los pacientes ganaron peso, pudiendo ser dados de alta más rápidamente (Mann *et al*, 1986; Vásquez-Ruiz *et al*, 2014).

Teniendo en cuenta lo antes expuesto, además de lo consignado en la sección 1.1, en el presente capítulo se expuso a ratones *nude* implantados con células de GBM *wild type* a condiciones de luz constante, para estudiar cómo la desincronización circadiana del organismo impacta en el crecimiento, la proliferación celular, y la prognosis del tumor.

2. Hipótesis y objetivos

Teniendo en cuenta lo expuesto en la “Introducción” del presente capítulo, es evidente que el reloj circadiano regula la progresión de diversos tumores. Por un lado, la interacción directa entre el reloj circadiano y el ciclo celular tumoral genera que la proliferación se vea afectada por la desregulación de los ritmos celulares en el tumor, y por otro, la desincronización del reloj circadiano del organismo promueve la proliferación en una diversidad de tumores, haciéndolos más agresivos. **Bajo la hipótesis de que el reloj circadiano tumoral y el sistema circadiano del organismo hospedador regulan la proliferación, progresión y pronóstico del glioblastoma**, el objetivo general del presente capítulo fue evaluar el efecto de alteraciones genéticas del reloj circadiano celular, y de la disrupción circadiana por luz constante, en la progresión y pronóstico tumoral, teniendo como objetivos específicos:

- Desarrollar y validar un modelo genético de deficiencia del reloj circadiano en las células LN229 de GBM humano.
- Evaluar el impacto que tiene la desregulación del reloj circadiano en las células LN229 en la progresión y pronóstico tumoral en ratones huéspedes *nude*.
- Evaluar el impacto de esquemas de luz constante en la progresión tumoral de GBMs (LN229 *wild type*) en ratones huéspedes *nude*.

3. Materiales y metodología.

Experimentos *in vitro*

3.1. Generación de la línea celular LN229 deficiente de *bmal1*

3.1.1. Plásmido StBL3E1

El plásmido StBL3E1 fue diseñado para disminuir (*knock down*) la expresión del gen *bmal1* mediante la tecnología CRISPR/Cas9. El mismo fue cordialmente brindado por el Dr. Mario Guido [Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC), Universidad Nacional de Córdoba, Argentina], y diseñado como se detalla en Wagner *et al.* (2019). Brevemente, el proceso consistió en diseñar guías de ARN de aproximadamente 20 pb teniendo como *target* el exón 2 del gen humano *bmal1* y las mismas fueron clonadas en el vector PX459 (Addgene), entre 243 y 269 pb. Luego de las correspondientes evaluaciones, el plásmido seleccionado fue aquel con la siguiente secuencia:

5' CTGGCTAGAGTGTATACGTT '3, obteniéndose así el plásmido PX459-Bmal1, el cual fue llamado StBL3E1. El mismo posee una secuencia que confiere resistencia a ampicilina para llevar a cabo la selección en procariontes, y de resistencia a puromicina como estrategia de selección en eucariotas.

Una vez recibido el plásmido por parte del CIQUIBIC, el mismo fue secuenciado mediante la técnica de Sanger (Macrogen, Corea) para corroborar su identidad, obteniéndose resultados correspondientes a la secuencia esperada.

3.1.2. Selección por puromicina

Previamente a la transfección de las células LN229, se determinó la concentración de puromicina que se utilizó para la posterior selección de las células transfectadas. Para tal fin, se sembraron 100.000 células/*well* en una placa de 12 *wells*, se realizó una curva de concentraciones tratando a las células LN229 con 0, 0.5, 0.8, 1, 1.5, 2, 2.5 o 3 µg/ml de puromicina (teniendo en cuenta el trabajo previo realizado por Wagner *et al.*, 2019), y 72 h después se procedió a realizar una tinción con cristal violeta 0.1%, leyendo absorbancia a 595 nm en el Cytation 5.

3.1.3. Transfección de LN229 con StBL3E1

Para generar una disminución en la expresión de *bmal1* en las células LN229, las mismas fueron transfectadas con el plásmido StBL3E1 utilizando Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher Scientific). Se sembraron 50.000 células/*well* en placas de 24 *wells* las cuales luego de 24 h fueron transfectadas con 1 µg de StBL3E1, 2 µl de reactivo P3000 y 3 µl de Lipofectamina en DMEM libre de SFB y de antibiótico. 6 h después, el medio fue reemplazado por DMEM completo. Luego de 72 h, se seleccionaron las células transfectadas con 1 µg/ml de puromicina (Sigma, EE. UU). 72 h después, el medio fue cambiado por DMEM completo. Una vez que las células seleccionadas alcanzaron la confluencia, se procedió a la amplificación de estas, llevándolas primeramente a una placa de 12 *wells*, luego a una de 6 *wells* y posteriormente a un frasco t25. Estas nuevas células fueron llamadas LN229E1, y serán nombradas de esta manera a lo largo de la presente tesis.

3.1.4. Evaluación de la edición génica

Para evaluar la correcta edición de CRISPR/Cas9 en el exón 2 de *bmal1*, se procedió a realizar una extracción del ADN celular por columnas (PB-L, Argentina), siguiendo las instrucciones del fabricante. Dicho ADN fue secuenciado mediante el método de Sanger (Macrogen, Corea) utilizando los siguientes cebadores: Cebador fw: 5'-CAACGTGCCATGTGTTA-3', Cebador rv: 5'-GAAGGCCAGGATTCCA-3, de forma tal de amplificar un fragmento de aproximadamente 300 pb del exón 2 de *bmal1*, flanqueando la región de reconocimiento de CRISPR mencionada anteriormente. Las secuencias del amplicón fueron alineadas con la secuencia de *bmal1* utilizando el *software* nBLAST (versión 2.11.0, NCBI, Bethesda, EE. UU), confirmando la presencia del exón 2 editado, en el sitio correspondiente al reconocimiento de CRISPR.

Para determinar si las células LN229E1 presentaban un fenotipo circadiano alterado, se llevaron a cabo registros bioluminiscentes de *bmal1* (ver sección 3.3) para evaluar el ritmo circadiano de *bmal1* a nivel de la actividad del promotor, y los ritmos de expresión tanto de *bmal1* como de *per1*, a nivel del ARNm (ver sección 3.4) y de la proteína (ver sección 3.5).

3.2. Expresión de ARNm de Bmal1

Las extracciones y las condiciones de PCR fueron las indicadas en el apartado "Materiales y Métodos generales". Se realizaron curvas con distintas concentraciones de ADNc molde y cebadores, para calcular la eficiencia de amplificación de dichos cebadores, seleccionando las siguientes concentraciones para los mismos: Actina, 0.4 μ M y Bmal1, 0.4 μ M.

La secuencia de los cebadores utilizados fue la siguiente:

Bmal1 *forward*: 5'-CCACTGTTCCAGGGATTCCA-3'

Bmal1 *reverse*: 5'-GGAGGCGTACTCGTGATGTT-3'

Actina *forward*: 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'

Actina *reverse*: 5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGA-3'.

3.3 *In-cell westerns* de BMAL1 y PER1

Se analizó la expresión de las proteínas BMAL1 y PER1 siguiendo el protocolo indicado en “Materiales y métodos generales”. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: 1/500 BMAL1 (Novus, Centennial, EE. UU) o 1/500 PER1 (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU).

3.4. Proliferación de las líneas celulares LN229 y LN229E1

Se llevaron a cabo ensayos de proliferación con las líneas LN229 y LN229E1 con el fin de comparar sus tiempos de duplicación. Se plaquearon 50.000 células/*well* en placas de 24 *wells*, A las 24, 48 y 72 h, las mismas fueron fijadas en metanol frío (-20 C) e incubadas con 2 µg/ml de DAPI. Las cuantificaciones fluorescentes se llevaron a cabo en el equipo Cytation 5, utilizando el canal DAPI (360/460 nm).

Experimentos *in vivo*

3.5. Registros de bioluminiscencia *in vivo*

Ratones *nude* macho y hembra fueron implantados con células LN229-Per2-luc o LN229-Bmal1-luc, según sección 3.6.2, con la salvedad de que los animales

permanecieron en recuperación durante cinco días bajo tratamiento de carprofeno 5 mg/kg. Tres semanas posteriores al implante, se llevó a cabo la medición de *bmal1* o *per1* en el tumor mediante bioluminiscencia cada 4 h durante 36 h, utilizando el equipo In Vivo Imaging System Lumina III (IVIS, Perkin Elmer, EE. UU). Previamente a cada medición, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de isoflurano 2% (Piramal) vaporizado en 200 ml/min de oxígeno, e inyectados subcutáneamente 5 minutos antes con luciferina (Goldbio) filtrada en filtro de 0,22 μm a una concentración de 150 mg/kg. Las imágenes de bioluminiscencia se analizaron utilizando el Living Software de imagen (Perkin Elmer, EE.UU). A las cuentas de bioluminiscencia obtenidas correspondientes al área tumoral, se les restó la bioluminiscencia basal (área fuera del tumor).

3.6. Progresión de glioblastomas de genotipos *wild type* (LN229) y *knock down* para *bmal1* (LN229E1) en ratones *nude*

3.6.1. Análisis de la sobrevida y volumen tumoral

Para determinar si existían diferencias en la sobrevida de ratones frente al implante de células LN229 y LN229E1, ratones *nude* macho fueron implantados con LN229 o LN229E1, u operados como control (*sham*) según sección 3.6.2. Dos veces por semana, se registró el peso, y se observó la aparición de síntomas del glioblastoma (de al menos dos de los tres síntomas ya descritos como indicativos de la enfermedad: pérdida de entre el 20 y 25% del peso, pérdida de equilibrio, lordosis), los cuales son indicativos del punto final experimental, analizando luego la sobrevida de cada grupo experimental. Con el fin de llevar a cabo un análisis del crecimiento tumoral a lo largo de la progresión del GBM para ambos tipos celulares,

en los días 25 y 40 post implante, y en punto final, los ratones fueron sacrificados, sus cerebros perfundidos según sección 3.6.3 y se llevaron a cabo tinciones de Nissl, según lo especificado en “Materiales y Métodos Generales”.

3.6.2. Ritmos de temperatura

Se registraron los ritmos diarios de temperatura corporal para monitorear posibles cambios en esta salida del reloj circadiano en los ratones implantados con LN229 y LN229E1 a lo largo de la progresión del GBM. Previamente a la implantación (basal), y a los días 25 y 40 post implante, se llevaron a cabo mediciones de temperatura durante 32 h cada 4 h utilizando una cámara térmica (Flir One) operada con un dispositivo móvil Samsung S7 SmartPhone (Samsung, Seoul, South Korea). Las mediciones se realizaron en condiciones de asepsia dentro de un *rack* aislador (Mazden Laboratories, EE.UU). Posteriormente, las imágenes térmicas fueron analizadas utilizando el software Flir tools (Teledyne Flir), según Mul Fedele *et al.* (2020), analizando la temperatura promedio correspondiente a la cabeza del ratón y promediando la temperatura de tres imágenes por cada ratón.

3.6.3. Evaluaciones exploratorias y motoras (test de cilindro)

Para evaluar el efecto del desarrollo tumoral en las funciones motoras, previamente a la implantación (basal), y a los días 25 y 40 post implante, se llevaron a cabo mediciones motoras entre ZT9 y ZT10 utilizando el test motor del cilindro, el cual consiste en cuantificar la habilidad motora del ratón dentro de un cilindro de plástico transparente de 15 cm de diámetro y 25 cm de alto, según Magno *et al* (2019). Para ello, se lo filmó con un celular Samsung S7 SmartPhone (Samsung, Seoul, South Korea) durante 5 minutos de forma frontal. Las mediciones se

realizaron en condiciones de asepsia dentro de un *rack* aislador (Mazden Laboratories, EE.UU). Los videos correspondientes fueron analizados determinando la cantidad de veces que el ratón se irguió sobre las dos patas traseras para intentar tocar la parte superior del cilindro con sus dos patas delanteras. Previamente a introducir el siguiente ratón, el cilindro fue limpiado con una mezcla de detergente y agua y 70% etanol en agua, de manera tal de eliminar todos los olores. Todas las medidas fueron llevadas a cabo en condiciones de esterilidad dentro de un rack.

3.7. Progresión de glioblastomas *wild type* (LN229) bajo condiciones normales de LO o de interrupción circadiana del reloj central por luz constante (LL) en ratones *nude*

3.7.1. Análisis de sobrevida y tamaño tumoral

Ratones *nude* macho fueron implantados con células LN229 u operados como control (*sham*) según sección 3.6.2 y sus pesos fueron monitoreados dos veces por semana durante todo el experimento. Posteriormente a los 5 días de recuperación, los mismos fueron transferidos a racks ventilados en jaulas individuales, expuestos a ciclos LO 12:12 durante una semana y luego divididos en subgrupos los cuales fueron expuestos a ciclos LO 12:12, o a condiciones de LL. Se registró el peso, se midió la sobrevida y se analizó el volumen tumoral mediante tinción de Nissl, según lo especificado en “Materiales y métodos generales”.

3.8. Análisis de resultados

3.8.1. Adquisición y procesamiento de imágenes

Las imágenes sin procesar se adquirieron y unieron automáticamente con el *software* GEN 5 en el sistema Cytation 5 y se procesaron con el *software* de análisis de imágenes Fiji (Schneider, Rasband y Eliceiri, 2012). Para el volumen tumoral se

analizaron imágenes fijando una región de interés sobre el tumor, lo que permitió obtener el área (en mm²) para cada ratón. Luego, para obtener el volumen tumoral (en mm³), se multiplicó el área por el factor: número de cortes con tumor obtenidos para cada cerebro x 0,035 mm.

Las imágenes de bioluminiscencia se analizaron utilizando el Living Software de imagen (Perkin Elmer, EE. UU), definiendo primeramente el valor umbral y luego tomando una región de interés (ROI) sobre el tumor, el cual permitió obtener las cuentas de bioluminiscencia totales correspondiente a la ROI, para luego restarle la bioluminiscencia basal (seleccionando una ROI por fuera de la región tumoral). Finalmente, los datos fueron normalizados entre 0 y 1 para facilitar su visualización.

3.8.2. Análisis estadístico

Para analizar la significancia estadística de los datos, se realizaron las siguientes pruebas paramétricas: prueba t de Student, ANOVA de una vía y ANOVA de medidas repetidas, considerando significativas a un $p < 0.05$.

Para los datos derivados de los experimentos de ritmos de temperatura, las mediciones bioluminiscentes *in vivo*, los análisis de ARNm de Bmal1, y los análisis de las proteínas BMAL1 y PER1, la presencia de ritmos circadianos fue evaluada mediante la función Meta2d, como se indica en “Materiales y Métodos generales”.

Los tiempos de supervivencia de los ratones con tumores expuestos a esquemas LL y LD o con células LN229E1 o LN229 se analizaron utilizando las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, que luego se compararon mediante una prueba no paramétrica de rango logarítmico.

Los registros de actividad locomotora se analizaron utilizando el *software* El Temps (Universidad de Barcelona, España) para obtener actogramas y

periodogramas de Chi cuadrado, analizando los períodos significativos del ritmo de actividad y su correspondiente amplitud o variabilidad estadística.

Los registros de bioluminiscencia *in vitro* se procesaron y analizaron con el software Chronostar 1.0. Primero, se filtraron con un promedio móvil de 3 horas para eliminar las variaciones de alta frecuencia. A continuación, se realizó un ajuste polinomial de cuarto orden en los datos y luego se restó de los datos (filtro de eliminación de tendencia) para eliminar la variación de baja frecuencia. Luego, se ajustó un modelo de coseno a los datos para determinar el período y la bondad de ajuste (CC). Las series de datos se consideraron circadianas si tenían un CC superior a 0,85 y un período medido dentro del rango de 23 a 26 horas, dentro del rango ya determinado como circadiano en otros trabajos (Refinetti *et al.*, 2013).

4.Resultados

4.1 Rol del reloj circadiano tumoral en la progresión del GBM

4.1.1 Construcción de un modelo genético deficiente en *bmal1*

Teniendo en cuenta la hipótesis del presente capítulo, la primera pregunta que se buscó responder es si las células LN229 poseen un reloj circadiano. Como ya fue expuesto en la “Introducción”, no todas las células tumorales presentan oscilaciones circadianas de genes reloj. Por lo tanto, se buscó determinar si las células LN229 presentan ritmos en los genes reloj *bmal1* y *per1*. Para tal fin, se llevaron a cabo registros bioluminiscentes tanto *in vitro* como *in vivo*. Primeramente, las células fueron transfectadas de forma transiente con el reportero pGL3-Bmal1-dLuc y se registró la bioluminiscencia generada por activación del promotor del gen *bmal1*. Mediante el análisis de las series temporales, se corroboró que las células de la línea LN229 presentan oscilaciones circadianas significativas en los niveles de bioluminiscencia, que perduran por más de 72 horas y cuya amplitud decrece con el tiempo. Estas oscilaciones presentan un período de 24.2 ± 0.1 horas (Figura 3.1), con un máximo a las 19.5 ± 0.6 HPS y un mínimo a las 7.5 ± 0.6 HPS. Se observó que los cultivos no transfectados con el plásmido reportero no presentaron un periodo significativo de entre 23 y 26 h, y presentaron valores de bioluminiscencia entre 300 y 400 veces menores que las células transfectadas.

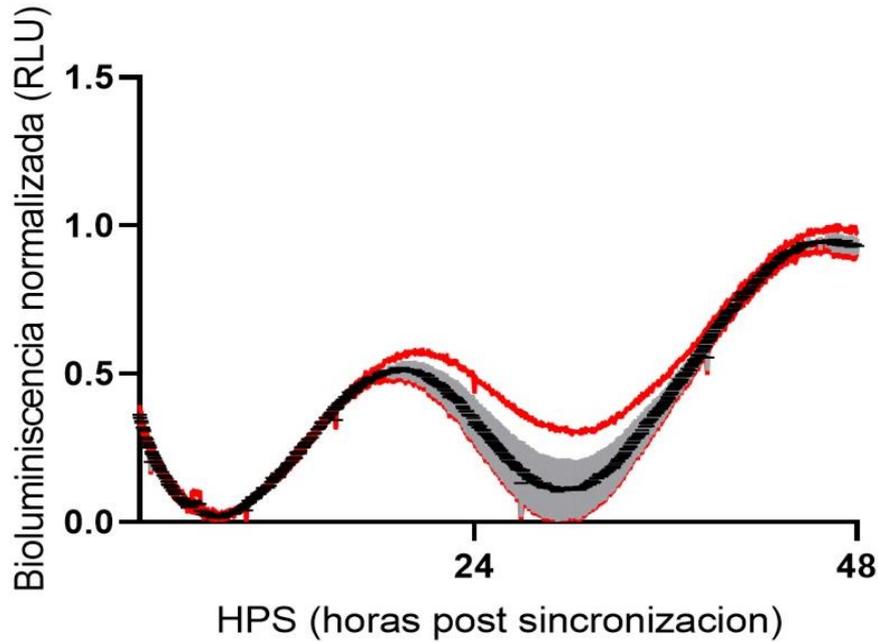


Figura 3.1. Las células LN229 presentan un ritmo circadiano en la actividad del promotor de *bmal1*. La activación se evaluó utilizando el plásmido pGL3-Bmal1-dLuc que contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga río abajo del promotor de *bmal1*. Bioluminiscencia normalizada, entre 0 (menor valor) y 1 (mayor valor), de *bmal1* en las células LN2299 durante 48 h (Periodo: 24.5 ± 0.4 h, CC: 0.79, Acrofase: 19.5 ± 0.6 HPS). Las líneas rojas indican las oscilaciones individuales, mientras que la línea negra indica la oscilación promedio ajustada, y la gris el EEM. $n=3$.

Por otro lado, se llevaron a cabo registros bioluminiscentes *in vivo* de las células LN229 implantadas en el núcleo estriado de ratones nude, para determinar si las mismas mantienen oscilaciones circadianas cuando desarrollan glioblastomas. La Figura 2 muestra los resultados de este experimento, donde se observan oscilaciones significativas tanto para *bmal1* como para *per2*, con un periodo de 24 h, encontrándose las mismas en antifase como es de esperarse para estos genes reloj, con una acrofase en ZT4 para *bmal1* y ZT18 para *per2* (meta2d para un periodo de 24 h, $p < 0.05$, Figura 3.2A). La Figura 3.2B muestra imágenes

representativas de bioluminiscencia *in vivo* para ZT0, 4, 16 y 20, donde se observa un máximo de bioluminiscencia para *bmal1* en ZT4, y para P2L en ZT20.

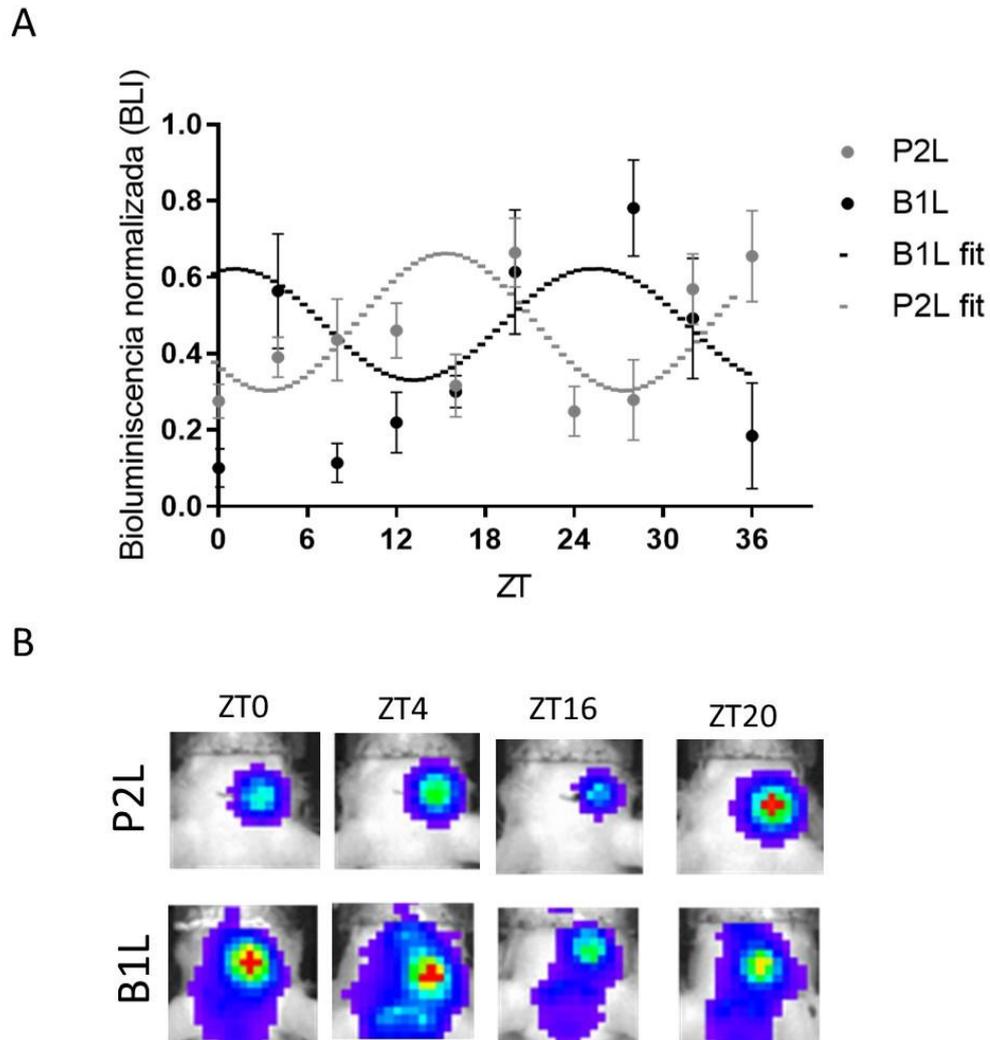


Figura 3.2: Las células LN229 presentan un ritmo circadiano en *bmal1* y *per1* *in vivo*. Bioluminiscencia normalizada de *bmal1* (B1L) y *per2* (P2L) *in vivo* de las células LN229 implantadas en el núcleo estriado derecho de ratones nude durante 36 h. (A) Se observa un ritmo circadiano tanto para *per2* como para *bmal1* (*bmal1* n=5, *per2* n=12 Media± EEM, meta2d para un periodo de 24 h $p < 0.05$, acrofase *bmal1*: ZT4, acrofase *per2*: ZT18). (B) Imágenes representativas de bioluminiscencia *in vivo* para *bmal1* y *per1* a los ZTs 0, 4, 16 y 20.

Se registró la actividad locomotora en rueda durante la progresión tumoral para evidenciar si se veía modificada durante el desarrollo del GBM. Se observó una disminución semanal significativa en la tasa de actividad (revoluciones/min) promedio diario (Figura 3.3), indicando que la progresión del GBM se correlaciona con una menor actividad de los animales, como ya había sido mostrado en otros trabajos (Duhart y Brocardo *et al.*, 2017). La disminución en la actividad locomotora precedió a la disminución del peso, indicando que esta variable comportamental podría ser un predictor más temprano del desarrollo del tumor que el peso.

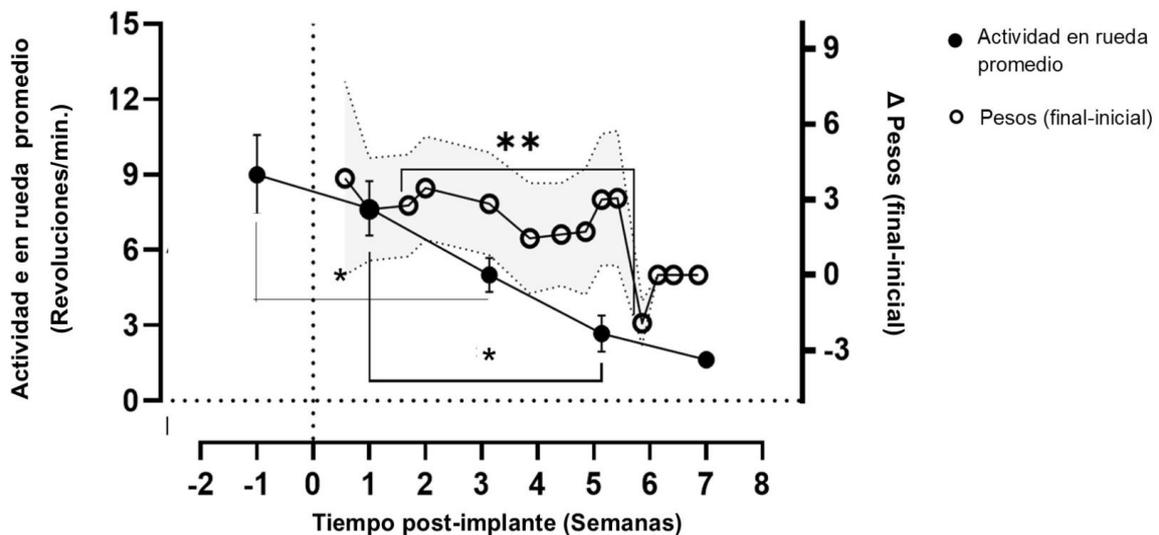


Figura 3.3 La actividad locomotora y el peso de los ratones *nude* implantados con células LN229 disminuyen a medida que progresa el tumor. La caída en la actividad promedio precede a la pérdida de peso. Tanto una semana antes del implante como una semana después, la actividad (eje izquierdo, puntos negros) es significativamente diferente al comparar con la semana cinco ($n=14$, Media \pm EEM, ANOVA de una vía, $p<0.05$). Test de comparaciones múltiples de Dunn: actividad semana -1 vs. actividad semana 5: $p<0.05$, actividad semana 1 vs. actividad semana 5: $p<0.05$). El eje derecho indica el cambio en el peso con respecto al peso inicial (puntos blancos) el sombreado gris representa el error estándar. El peso de la semana dos fue significativamente diferente al de las semanas cuatro y seis ($n=14$, Media \pm EEM, ANOVA de una vía, $p<0.05$). Test de comparaciones

múltiples de Dunn: peso semana 2 vs actividad semana 4: $p < 0.05$, peso semana 2 vs peso semana 6: $p < 0.05$). Se destaca que, con el avance del protocolo, los ratones fueron mostrando síntomas y por ende fueron sacrificados. Por lo tanto, cabe destacar que: tres ratones murieron entre las semanas cuatro y cinco, seis ratones murieron entre las semanas cinco y seis y dos ratones murieron entre las semanas seis y siete, quedando sólo uno en la semana siete.

Habiéndose establecido la ritmicidad circadiana de las células LN229 tanto *in vivo* como *in vitro*, se procedió a la generación de un modelo de GBM arrítmico. Por lo tanto, teniendo en cuenta que el objetivo del presente capítulo fue la generación y evaluación de un modelo de GBM con un reloj circadiano deficiente en pos de estudiar la interacción entre el reloj circadiano y la progresión tumoral, se optó por realizar una inhibición del gen *bmal1* en las células LN229. Dicha inhibición se realizó utilizando el plásmido StBL3E1, diseñado para disminuir la expresión del gen *bmal1*. El mismo está diseñado teniendo al exón 2 de *bmal1* humana como blanco, y cuenta con resistencia a puromicina para poder seleccionar las células que efectivamente incorporan el plásmido (ver sección 3.2).

En primera instancia se llevó a cabo una curva con distintas concentraciones de puromicina en células LN229 para determinar la concentración del antibiótico que será utilizada posteriormente para la selección de las células con la edición génica. No todas las células poseen la misma respuesta frente a la puromicina. Algunos tipos celulares poseen una leve resistencia a este antibiótico, y otros son extremadamente sensibles. Es por esto por lo que resulta importante llevar adelante las curvas de selección en células sin la edición génica, de forma tal de determinar cuál es la concentración que inhibe efectivamente la proliferación de las mismas.

Como se observa en la Figura 3.4, a partir de 1 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina sobreviven menos del 20% de las células (ANOVA de una vía, $p < 0.05$, Test de Tukey: 0 vs 1, $***p < 0.0001$). Por lo tanto, se seleccionó la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ para tratar a los cultivos transfectados con el plásmido. Los cultivos fueron transfectados y tratados con el antibiótico (ver sección 3.2.2), sobreviviendo, por tanto, mayoritariamente aquellas células que incorporaron el plásmido.

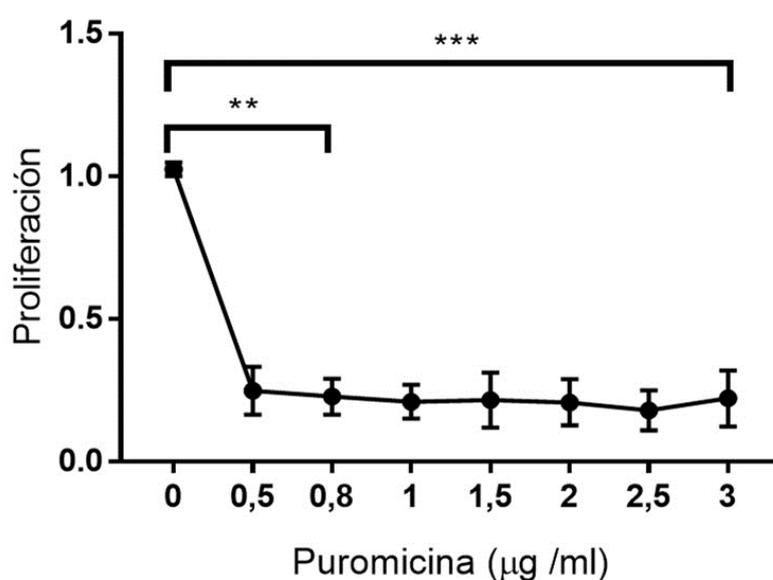


Figura 3.4. LN229 tratadas con distintas concentraciones de puromicina. Proliferación medida con cristal violeta 0,1% de las células LN229 frente al tratamiento con 0, 0,5, 0,8, 1, 1,5, 2, 2,5, o 3 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina (Media \pm EEM, $n=3$, ANOVA de una vía, $p < 0.05$, Test de Tukey: 0 vs 0.5, $**p < 0.01$, 0 vs 0.8, $**p < 0.01$, 0 vs 1, $***p < 0.001$, 0 vs 1.5, $***p < 0.001$, 0 vs 2, $***p < 0.001$, 0 vs 2.5, $***p < 0.001$, 0 vs 3, $***p < 0.001$).

Una vez seleccionadas y amplificadas las células LN229E1, fue necesario corroborar que la edición génica haya ocurrido efectivamente. Para tal fin, se llevó a cabo en primera instancia una secuenciación mediante el método de Sanger y,

posteriormente, un alineamiento de secuencias entre la secuencia editada y la secuencia *wild type* utilizando el *software* Blastn. Como puede observarse en la Figura 3.5, las células LN229E1 poseen una edición en el exón 2 de *bmal1* en el sitio de corte guía de Cas9 (recuadro marcado en rojo, donde se observa que ocurre el intercambio de una Timina por una Adenina), lo cual genera un posterior corrimiento del marco de lectura, indicando que el exón 2 fue exitosamente editado.

A

Sequence ID: Query_6344/ Length: 320
Range 1: 39 to 293

Score:460 bits(249), Expect:1e-134,
Identities:254/256(99%), Gaps:2/256(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 5 ACAGTT-CATGGGTACTGAGAGGAGGGGGTGCCTGGCCTGCCTGGAACACTGGGGAGGCT 63
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 39 ACAGTTCATGGGTACTGAGAGGAGGGGGTGCCTGGCCTGCCTGGAACACTGGGGAGGCT 98
|
Query 64 TACAGGGAAAAACTGTCCAATGGATTTAAAGGACAAGCAGGGATTTTCTAGGCAAAGAAG 123
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 99 TACAGGGAAAAACTGTCCAATGGATTTAAAGGACAAGCAGGGATTTTCTAGGCAAAGAAG 158

Query 124 CAGAATGGGCATCCAGGAGTATGGTAAATCAAACTTATTGGGTGCTATGAATTTAAAG 183
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 159 CAGAATGGGCATCCAGGAGTATGGTAAATCAAACTTATTGGGTGCTATGAATTTAAAG 218

Query 184 CTAAACTTTTATTTTCATTGGCTTTTAGGTGGTGGCTAGAGTGATACCGTTTGGACC 243
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 219 CTAAACTTTTATTTTCATTGGCTTTTAGGTGGTGGCTAGAGTGATACCGTTTGGACC 277
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
      CTGGCTAGAGTGATA-CGT

Query 244 CAAGCTTAACTTTTCC 259
      ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 278 CAAGCTTAACTTTTCC 293
```

B

Sequence ID: Query_12599 Length: 320
Range 1: 39 to 299

Score:449 bits(243), Expect:3e-131,
Identities:256/262(98%), Gaps:2/262(0%), Strand: Plus/Plus

```
Query 7 ACAGTT-CATGGGTACTGAGAGGAGGGGGTGCCTGGCCTGCCTGGAACACTGGGGAGGCT 65
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 39 ACAGTTCATGGGTACTGAGAGGAGGGGGTGCCTGGCCTGCCTGGAACACTGGGGAGGCT 98

Query 66 TACAGGGAAAAACTGTCCAATGGATTTAAAGGACAAGCAGGGATTTTCTAGGCAAAGAAG 125
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 99 TACAGGGAAAAACTGTCCAATGGATTTAAAGGACAAGCAGGGATTTTCTAGGCAAAGAAG 158

Query 126 CAGAATGGGCATCCAGGAGTATGGTAAATCAAACTTATTGGGTGCTATGAATTTAAAG 185
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 159 CAGAATGGGCATCCAGGAGTATGGTAAATCAAACTTATTGGGTGCTATGAATTTAAAG 218

Query 186 CTAAACTTTTATTTTCATTGGCTTTTAGGTGGTGGCTAGAGTGATACCGATTGGACC 245
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 219 CTAAACTTTTATTTTCATTGGCTTTTAGGTGGTGGCTAGAGTGATACCGATTGGACC 277
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
      CTGGCTAGAGTGATA-CGT

Query 246 CAAGCTTATCTTTTGGCATGTG 267
      ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 278 CAAGCTTAACTTTTCCAATGTG 299
```

Figura 3.5. Secuencias del exón 2 de *bmal1 wild type*, y del editado mediante Crispr/Cas9.

Alineamiento de secuencias mediante Blastn de (A) *Query*: secuencia correspondiente a *bmal1 wild type* (LN229); *Subject*: secuencia correspondiente a un fragmento del exón 2 de *bmal1*. En rojo: sitio de edición de Crispr/Cas9. Identidad: 254/256 (99%). (B) *Query*: secuencia correspondiente a *bmal1 E1* (LN229E1); *Subject*: secuencia correspondiente a un fragmento del exón 2 de *bmal1*. En rojo: sitio de edición de Crispr/Cas9. Identidad: 256/262 (98%).

Sin embargo, el análisis de la edición génica a nivel del ADN nuclear de las células no es suficiente para constatar el *knock down* de *bmal1*. Es necesario determinar si la función del gen está alterada a nivel transcripcional y traduccional, evaluando el fenotipo celular. Para tal fin, se evaluó tanto la expresión génica de *bmal1* mediante el plásmido pGL3-Bmal1-dLuc, como los niveles y expresión rítmica del ARNm de Bmal1, y de las proteínas reloj BMAL1 y PER1, en las células LN229E1 y LN229 *wild type*.

Primeramente, se llevaron a cabo registros bioluminiscentes transfectando tanto a las células LN229 como a las LN229E1 de forma transiente con el reportero pGL3-Bmal1-dLuc en las condiciones establecidas anteriormente. En la Figura 3.6 se observa que las células LN229 presentan ritmos circadianos de gran amplitud en la actividad del promotor de *bmal1*, con un período significativo de 24 h (como ya se mostró anteriormente, Figura 3.1), mientras que las células LN229E1 pierden dicha ritmicidad, mostrando fluctuaciones ruidosas no circadianas.

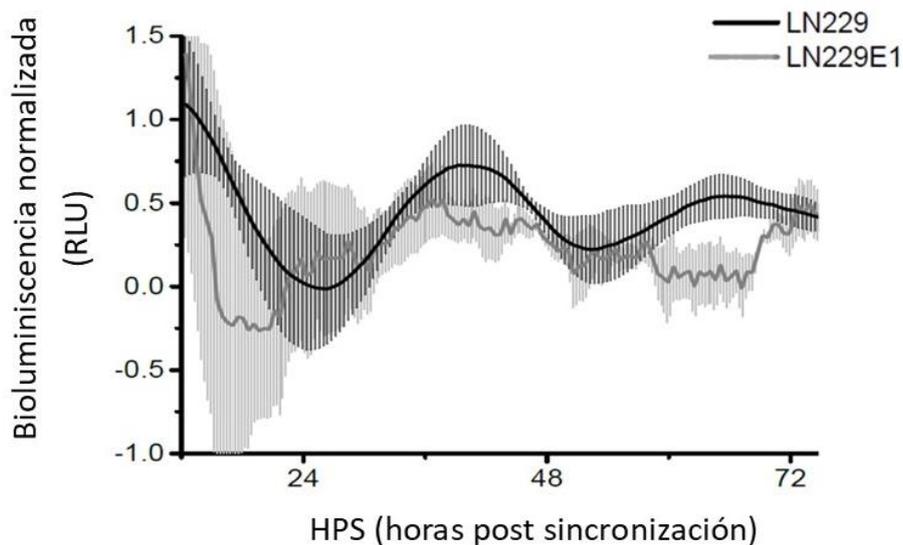


Figura 3.6. Las células LN229E1 pierden la activación circadiana del promotor de *bmal1*. La activación del promotor *bmal1* se evaluó utilizando el plásmido pGL3-Bmal1-dLuc que contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga río abajo del promotor *bmal1*. Se muestra la bioluminiscencia normalizada de *bmal1* en las células LN2299 y LN229E1 durante 72 h (n=4, LN229: periodo: 26±1 h, CC: 0.98, Acrofase: 18.5±0.5 HPS; LN229E1: ns). La línea negra indica la oscilación promedio ajustada de LN229, las líneas grises oscuro corresponden al EEM. Las líneas grises corresponden a los datos de LN229E1, los cuales no pudieron ser ajustados a un ritmo circadiano significativo.

Cuando se evaluaron los niveles del ARNm de Bmal1 mediante qPCR a lo largo de 24 h, se observa que las células LN229 poseen un ritmo circadiano significativo, con un máximo en 16 HPS y un mínimo en 4 HPS (JTK: período 24 h, $p < 0.05$, LS: ns, Meta2d: período 24 h, $p < 0.05$, Amp: 14.8). En las células LN229E1, si bien el ritmo de 24 h resulta significativo, presenta una pérdida de amplitud (Bmal1 LN229E1: JTK: período 24 h, $p < 0.05$, LS: ns, Meta2d: período 24 h, $p < 0.05$, Amp: 1.5) (Figura 3.7).

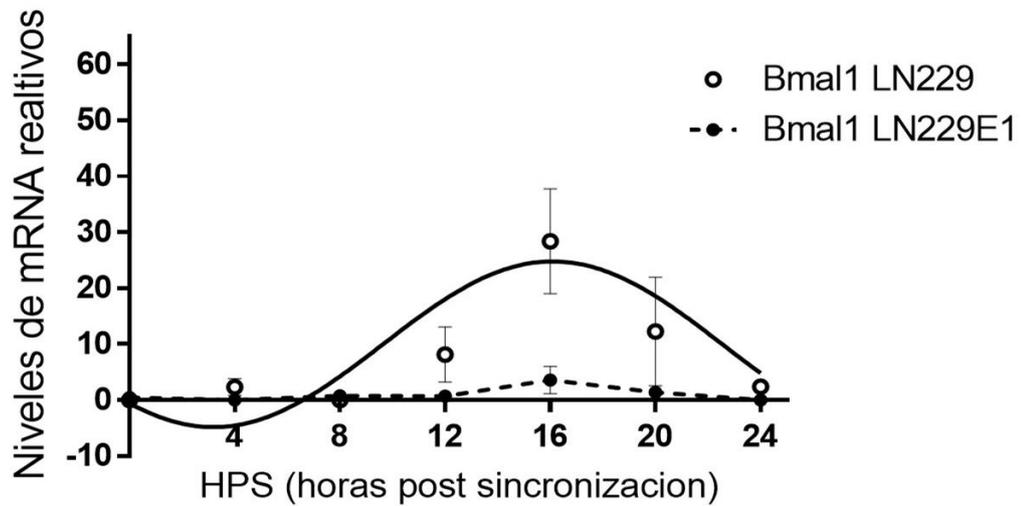


Figura 3.7. Ritmos circadianos en los niveles de ARNm de Bmal1 en las células LN229 *wild type* y en las células LN229E1. Después de la sincronización con SFB, las células se fijaron a intervalos de 4 horas y se extrajo su ARNm. La qPCR se realizó con cebadores para Bmal1 para determinar la cantidad de niveles de dicho ARNm en relación con los niveles de ARNm de actina. En las células LN229, los niveles de ARNm de Bmal1 muestran ritmos circadianos significativos (Período de meta2d: 24 h, $p < 0,05$, Amplitud:14.8). Si bien se obtuvieron también ritmos circadianos significativos de Bmal1 en las células LN229E1 (Período de meta2d: 24 h, $p < 0,05$, Amplitud=1.5) los mismos presentan una amplitud muy disminuida en comparación con las células LN229. Media \pm EEM, n=4.

Finalmente, se procedió a evaluar la expresión de las proteínas circadianas PER1 y BMAL1, para de esta manera confirmar el fenotipo de las células LN229E1 tanto a nivel de transcripción como de traducción. Se observa que ambas proteínas presentan un ritmo circadiano significativo en las células LN229 (BMAL1: JTK: 24 h período, $p < 0.0001$, LS: período 24 h, $p < 0.01$, Meta2d: período 24 h, $p < 0.0001$, PER1: JTK: período 24 h, $p < 0.05$, LS: ns, Meta2d: período 24 h, $p < 0.05$), con un

máximo en 21 HPS y un mínimo en 9 HPS para la proteína BMAL1, y un máximo en 6 HPS y un mínimo en 18 HPS para la proteína PER1, estando ambas proteínas en antifase (Figura 3.8 A). Al evaluar a las células LN229E1, dicho ritmo circadiano no está presente tanto para BMAL1 como para PER1 (BMAL1: JTK: ns, LS: ns, Meta2d: ns; PER1: JTK: ns, LS: ns, Meta2d: ns) (Figura 3.8 B). A su vez, se observa una disminución en los niveles de Bmal1, tanto a nivel del ARNm como de la proteína, como es de esperarse luego de un *knock down*. La Figura 3.8 C y D muestra imágenes representativas de las inmunofluorescencias, donde la mayor reactividad ocurre en 9 HPS para BMAL1 y en 18 HPS para PER1, mientras que estas diferencias desaparecen en LN229E1.

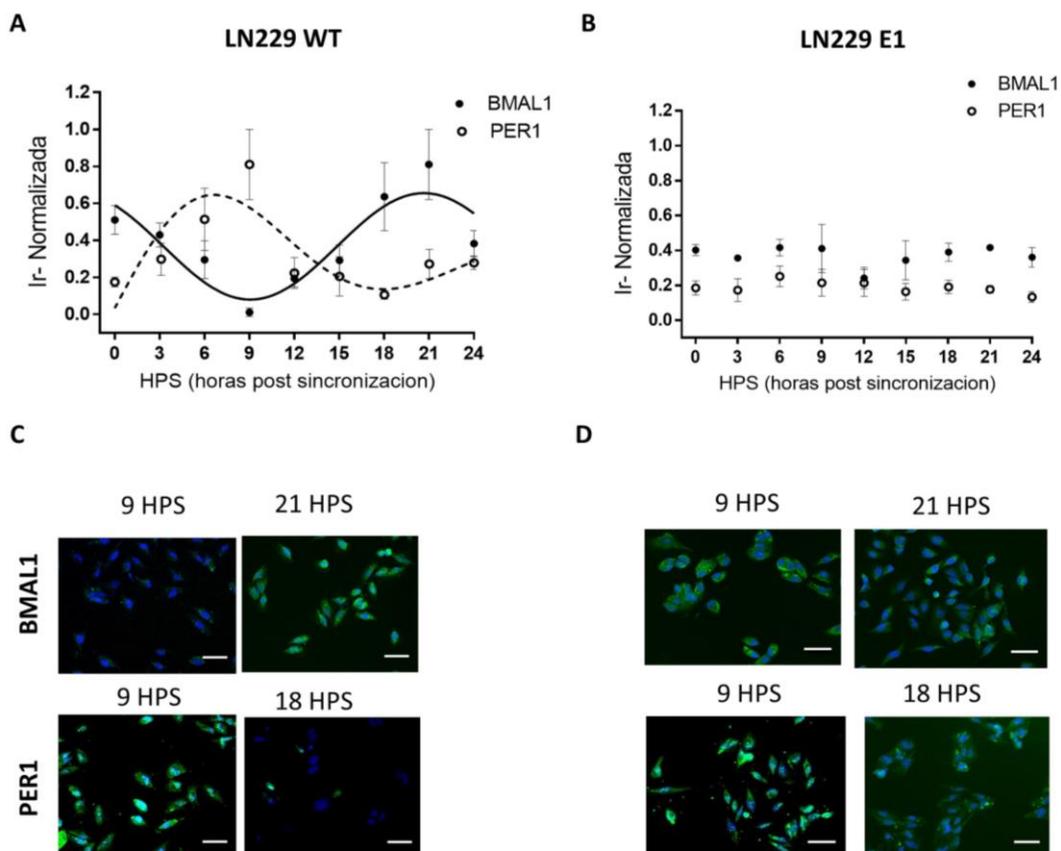


Figura 3.8. Las células LN229 presentan ritmos circadianos en los niveles de las proteínas BMAL1 y PER1, los cuales no se observan en las células LN229E1. Niveles circadianos de

expresión de proteínas de BMAL1 y PER1 en células LN229 y LN229E1. Después de la sincronización con SFB, las células se fijaron a intervalos de 3 h, se procesaron para inmunocitoquímica para PER1 o BMAL1 (canal verde) y los núcleos se contrastaron con DAPI (canal azul). (A) BMAL1 y PER1 presentaron una expresión circadiana y en antifase en LN229 (media±EEM, n=3, BMAL1: período meta2d: 24 h, p<0,0001, PER1: período meta2d: 24 h, p<0,05). (B) No se observaron ritmos circadianos en LN229E1 (meta2d: p>0,05). (C) y (D) Imágenes representativas obtenidas con el sistema Cytation 5, para confirmar cualitativamente los resultados. Las barras de escala representan 20 µm.

Por lo tanto, se evidencia que las células LN229E1 fueron editadas con la tecnología Crispr/Cas9 de forma exitosa por la pérdida de la expresión circadiana de *bmal1*, un gen canónico del reloj molecular, obteniendo el fenotipo esperado. Esto fue verificado tanto a nivel de activación del promotor de *bmal1*, como en los niveles del ARNm y de la proteína BMAL1. Además, se verificó la pérdida del ritmo de PER1, que forma parte del bucle positivo del reloj, y cuya transcripción depende de la interacción del heterodímero CLOCK: BMAL1 en su E-box. Por lo tanto, a partir de la desregulación de *bmal1* mediante edición con CRISPR/Cas9, se obtuvo un modelo genético deficiente del reloj circadiano, el cual será utilizado a lo largo de esta tesis.

4.1.2. Evaluación de la progresión del GBM frente a la ausencia de un reloj circadiano tumoral

Habiendo obtenido el modelo genético deficiente del reloj circadiano, se procedió a caracterizarlo tanto *in vitro* como *in vivo*, para determinar si la ausencia de ritmos circadianos a nivel celular genera diferencias en la progresión y pronóstico del GBM.

En primera instancia, se procedió a evaluar la proliferación de las células LN229E1 con respecto a las LN229. En la figura 3.9, se observa que las células LN229E1 poseen una proliferación menor que las células LN229 al ser evaluadas a las 24, 48 y 72 h *in vitro* (ANOVA de una vía, $p < 0.05$).

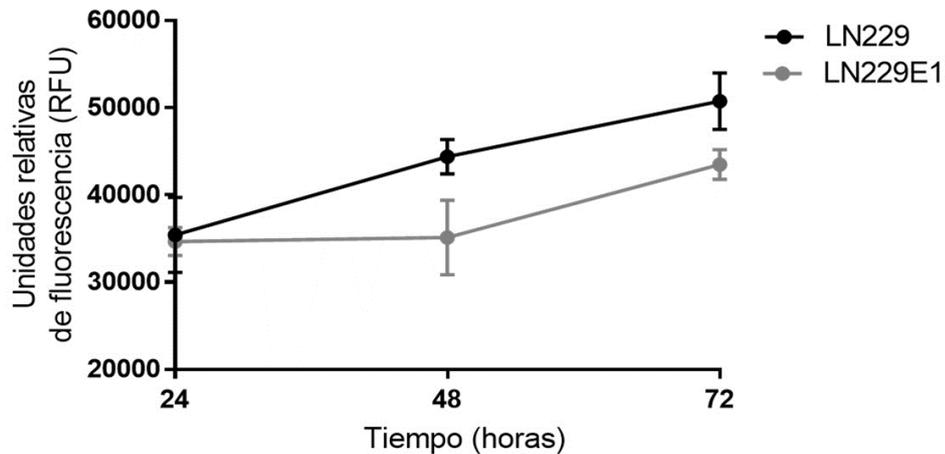


Figura 3.9. Las células LN229E1 poseen una menor tasa de proliferación que las LN229. Proliferación de las células LN229 y LN229E1 medidas a las 24, 48 y 72 h mediante fluorescencia con DAPI. Los resultados se muestran en Unidades relativas de fluorescencia. Se observa una menor tasa de proliferación para las células LN229E1 (ANOVA de dos vías, factor tiempo, $p < 0.01$, factor fenotipo, $p < 0.05$, media \pm EEM, $n=3$).

Por lo tanto, se decidió evaluar la progresión del GBM originado por estas células *in vivo*, implantando ambos tipos celulares en ratones *nude*. Primeramente, se procedió a evaluar la supervivencia de ratones inyectados con LN229 y LN229E1. Se tomó como punto final del experimento la metodología ya establecida previamente por nuestro laboratorio, la cual consiste en el momento en que se da la aparición de al menos dos de los tres síntomas ya descritos como indicativos de

la enfermedad: pérdida de entre el 20 y 25% del peso, pérdida de equilibrio o lordosis.

Mientras que para los ratones que fueron inyectados con LN229 la mediana de supervivencia fue de 61 días, para aquellos inyectados con LN229E1 fue de 56 días, obteniéndose diferencias significativas entre ambas curvas de supervivencia (prueba de rango logarítmico de Mantel-Cox, $*p < 0,05$) (Figura 3.10 A). Se observa que no hay diferencias en el peso que ambos fenotipos alcanzan en el punto final (Figura 3.10 B).

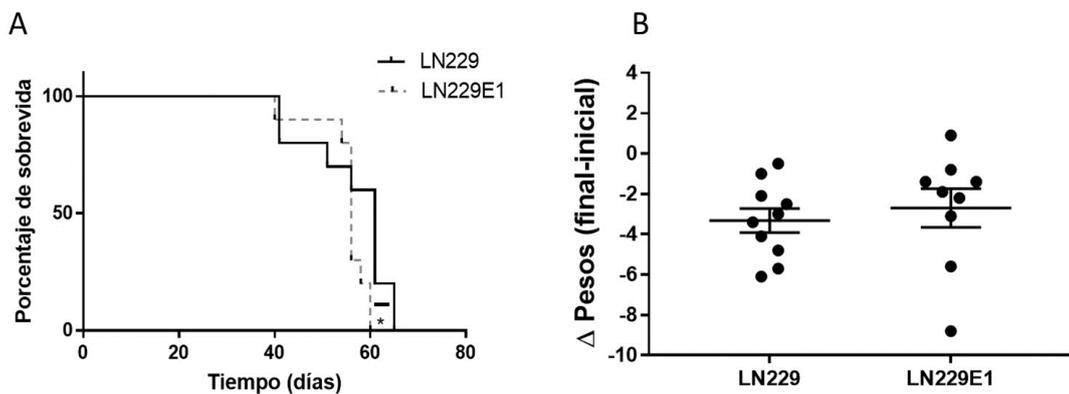


Figura 3.10. Los ratones implantados con las células LN229E1 *knock down* de *bmal1* muestran una menor supervivencia en comparación con los implantados con las LN229 *wild type*. (A) Las curvas de supervivencia de los ratones *nude* implantados con LN229 o LN229E1 fueron significativamente diferentes ($n=10$, prueba de rango logarítmico de Mantel-Cox, $*p < 0,05$, mediana de supervivencia: LN229: 61 días; LN229E1: 56 días). (B) Diferencial en el peso de los ratones implantados con LN229 o LN229E1, expresado como el valor del peso en el punto final, menos el valor del punto inicial. No hay diferencias significativas entre ambos fenotipos (Test de t: ns).

A continuación, se procedió a evaluar el volumen tumoral en distintos estadios de la progresión del GBM. Se tomaron dos puntos temporales previos al

punto final, eligiéndose como punto temprano el día 25 post implantación, y como punto intermedio el día 40 post implante. La figura 3.11 muestra dichos resultados. Se observa que tanto en los días 25 como 40 el volumen tumoral es significativamente mayor en aquellos ratones implantados con células LN229E1 deficientes de *bmal1* (Figura 3.11 A y C), mientras que no se evidencian diferencias en el punto final de la progresión del tumor para cada ratón (Figura 3.11 E). Las figuras B, D y E son imágenes de microscopía de campo claro representativas de los tamaños tumorales en los distintos estadios para ambos fenotipos. Como se puede observar, tanto para el día 25 (Figura 3.11 B) como para el día 40 (Figura 3.11 D), el volumen tumoral originado por las células LN229E1 es mayor. Finalmente, la figura 3.11 G muestra el crecimiento del tumor a lo largo de todo el experimento, observándose el aumento con el correr de los días y alcanzando valores de punto final esperados, ya descritos en otros trabajos (Kim *et al.*, 2015).

La ausencia de un reloj circadiano en las células tumorales estaría acelerando el crecimiento y por lo tanto la progresión, disminuyendo así la mediana de supervivencia observada en los ratones *nude*.

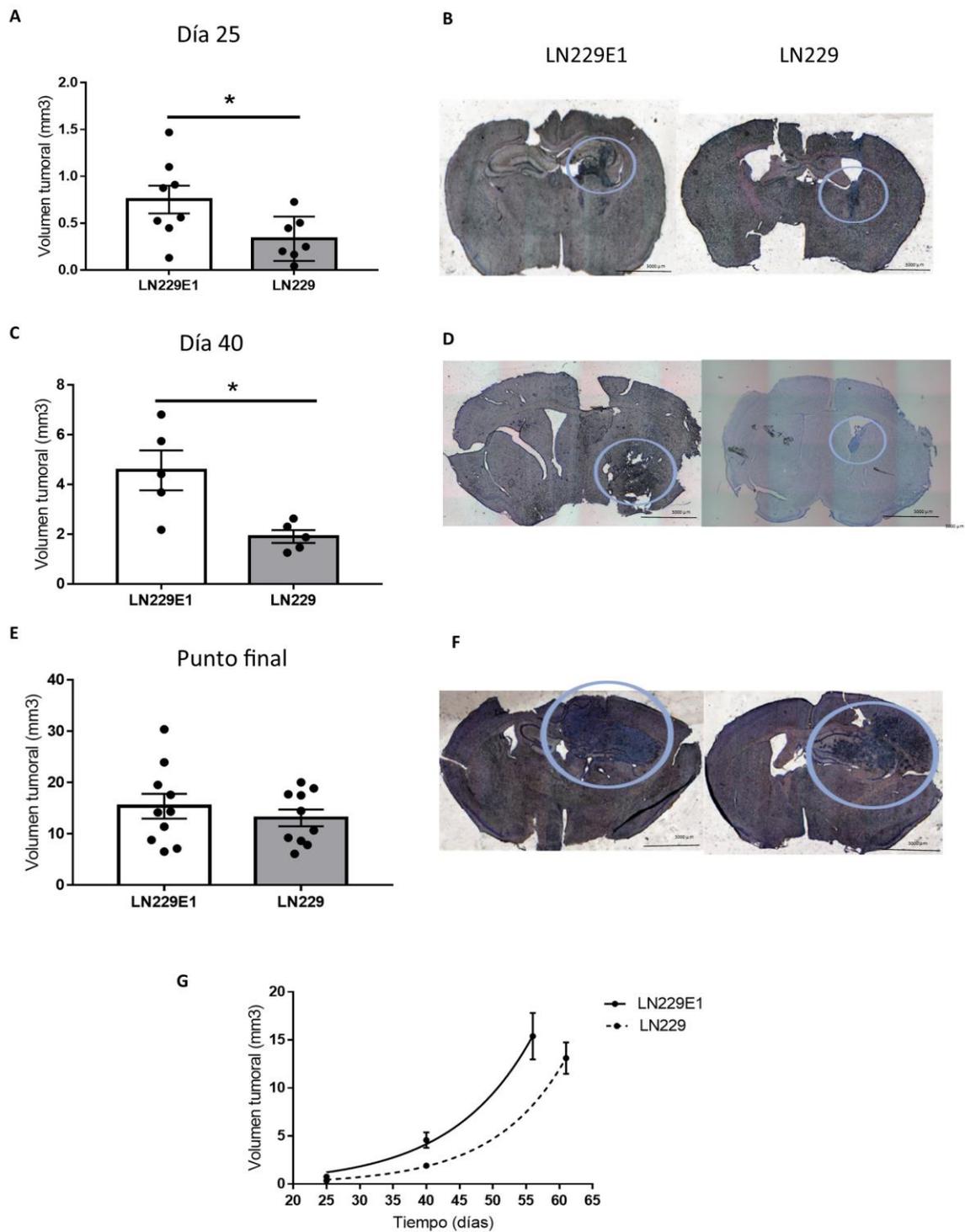


Figura 3.11. El volumen tumoral es mayor en los ratones implantados con LN229E1 en los días 25 y 40 post implante. Volumen tumoral de ratones implantados con células LN229 o LN229E1 en el día 25 post implante (A) (Test de t, * $p < 0,05$, $n = 8$), en el día 40 (C) (Test de t, * $p < 0,05$, $n = 5$), y en

el punto final de cada ratón (E) (test de t, ns, n=10). Micrografías representativas (microscopía de campo claro en color, 2,5 X) de cortes coronales del cerebro obtenidas para cada genotipo tumoral en el día 25 (B), en el día 40 (D), y en punto final (F). El tumor se encuentra resaltado con un círculo azul. (G) Ajuste realizado con ecuación de crecimiento exponencial sobre los datos del volumen tumoral.

Teniendo en cuenta que las células LN229E1 son deficientes del gen *bmal1* y de su control sobre el reloj circadiano, se decidió evaluar si la presencia de un tumor con estas características genera variaciones en la fisiología y el comportamiento circadiano de los ratones. Se procedió por tanto a medir los ritmos circadianos de los ratones a través de la medición de la temperatura corporal periférica, utilizando un sistema de cámaras térmicas. Se registró la temperatura cada 4 h durante 32 h, obteniendo su variación diaria en tres estadios del desarrollo del tumor: basal (previo a la implantación), día 25, y día 40 post implantación con las líneas LN229, LN229E1 de GBM, o en ratones *sham*.

Se observó que, en los tres estadios, tanto para ambos fenotipos como en los controles *sham*, los ratones presentan un ritmo diario de temperatura significativo con un periodo de 24h, un máximo durante la noche (fase de actividad), y un mínimo durante el día (reposo), como ya ha sido descrito para esta especie nocturna (Figura 3.12 A, B y C). Sin embargo, no se observan diferencias en los ritmos entre los genotipos tumorales en ningún estadio de la progresión, ni con respecto a la amplitud (Figura 3.12 D) ni la acrofase (Figura 3.12 E), indicando que ésta no afecta los ritmos de temperatura corporal de los ratones. Es importante destacar que al analizar la acrofase de los ritmos en los tres grupos experimentales (LN229, LN229E1 y *sham*) el factor estadio resultó significativo (ANOVA de efectos mixtos,

factor estadío $p < 0.05$; factor grupo, ns, factor estadío x grupos, ns). Si bien parecería haber una diferencia, es importante analizarla en profundidad. En primera instancia, se evidencia una diferencia significativa entre basal y día 25 en LN229E1 (Test de comparaciones múltiples de Tukey: basal LN229E1 vs día 25 LN229E1: $p < 0.05$), diferencia que también se observa para el grupo *sham* entre día 25 y día 40 (Test de comparaciones múltiples de Tukey: *sham* día 25 vs *sham* día 40: $p < 0.05$), por lo cual se evidencia que esta diferencia no está asociada a la presencia del tumor y su progresión. En segunda instancia, dicha diferencia es de entre 1,5 y 2 h, dependiendo el grupo experimental que se analice, diferencia que se encuentra dentro del error de la frecuencia de muestreo (4 h), por lo cual no presenta importancia biológica.

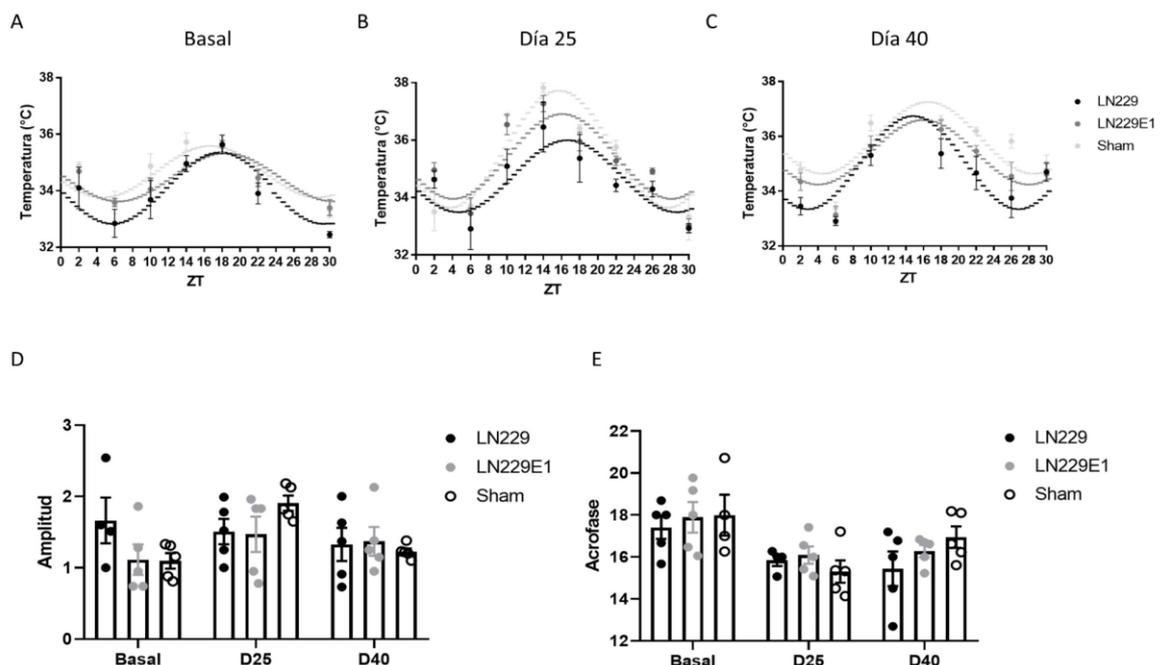


Figura 3.12. Los ratones implantados con células LN229, LN229E1, o *sham*, presentan ritmos de temperatura estables durante todo el protocolo. Ritmos de temperatura de ratones implantados con LN229 o LN229E1, o *sham* durante 32 h. (A) Basal (pre-implantación) (n=5, LN229,

LN229E1 y *sham*: JTK: período de 24 h, $p < 0,05$, LS: período de 24 h, $p < 0,05$, Meta2d: período de 24 h, $p < 0,05$, Acrofase LN229: 17,1; Acrofase LN229E1: 17,4; Acrofase *sham*: 15,6). (B) Día 25 (n=5, JTK: período de 24 h, $p < 0,01$, LS: período de 24 h, $p < 0,05$, Meta2d: período de 24 h, $p < 0,01$, acrofase LN229: 17,2, acrofase LN229E1: 17,4, acrofase *sham*: 17,2). (C) Día 40 (n=5, JTK: período de 24 h, $p < 0,01$, LS: período de 24 h, $p < 0,05$, Meta2d: período de 24 h, $p < 0,01$. Acrofase LN229: 16,2, acrofase LN229E1: 17,6, acrofase *sham*: 17,6). (D) Amplitud de los ritmos de los ratones individuales para LN229, LN229E1 y Sham. No se evidencian diferencias significativas (ANOVA de efectos mixtos, ns). (E) Acrofases de los ritmos de los ratones individuales para LN229, LN229E1 y Sham. (ANOVA de efectos mixtos, factor tiempo $p < 0,05$; factor grupo, ns, factor tiempo x grupos, ns. Test de comparaciones múltiples de Tukey: basal LN229E1 vs día 25 LN229E1: $p < 0,05$. Sham día 25 vs sham día 40: $p < 0,05$).

Las células de GBM son implantadas en el núcleo estriado dorsal de los ratones, como ya fue mencionado anteriormente. Este núcleo posee diversas funciones, entre las cuales se encuentra la coordinación motora. Teniendo en cuenta que al momento de aparición de los síntomas de la enfermedad los ratones ya se encuentran muy cercanos al punto final, se decidió llevar a cabo evaluaciones motoras en los puntos previos. De este modo, es posible observar si existen diferencias entre ambos fenotipos, obteniendo una evaluación más temprana de la prognosis del GBM.

Para tal fin, tanto en el punto basal como en el día 25 y 40, se llevó a cabo el test del cilindro. Dicha prueba es ampliamente utilizada para evaluar alteraciones motoras en diversas patologías del sistema nervioso central, por lo tanto, se decidió utilizarlo en este caso para analizar la progresión del GBM.

Los resultados obtenidos demuestran que no hay una diferencia significativa en el desempeño motor de los ratones *sham* a lo largo del protocolo, como era de

esperarse. Cabe destacar que, pese a no ser significativa, se observa una tendencia a la baja en la actividad motora a medida que pasa el tiempo, lo cual responde a que la prueba deja de ser novedosa para los animales, y esto genera siempre valores más bajos a medida que las pruebas se repiten sucesivas veces, como ya ha sido descrito en trabajos previos.

A diferencia de los ratones *sham*, se observa que hay una pérdida significativa de actividad motora para los ratones implantados con LN229 y LN229E1, la cual es diferente para ambos fenotipos (ANOVA de medidas repetidas, factor tiempo, $p < 0,05$, Factor Fenotipo: $p < 0,05$) (Figura 3.13). A su vez, existe una diferencia significativa entre el día 25 y el día 40 en ratones implantados con células LN229E1, la cual está ausente en los ratones implantados con células LN229. Estos resultados añaden evidencia a la conclusión de que la falta de *bmal1* en el tumor genera un fenotipo más agresivo en este modelo de GBM, generando en este caso mayor pérdida de actividad motora en los ratones implantados con células LN229E1.

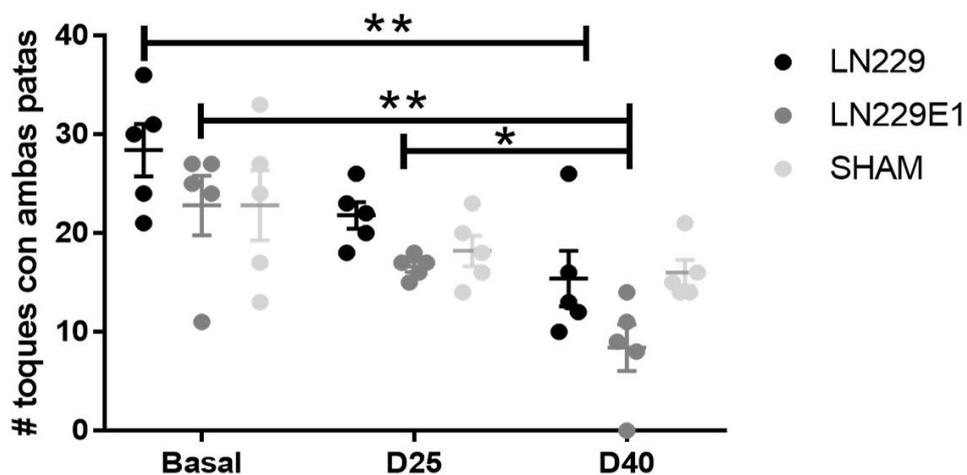


Figura 3.13. Desempeño motor en el test del cilindro durante la progresión del GBM. Actividad motora (número de toques con ambas patas durante 5 minutos) de ratones implantados con LN229

o LN229E1, o *sham*, determinada en Basal (pre-implantación), día 25 y día 40. Los ratones con GBMs *knock down* para *bmal1* muestran un peor desempeño en el día 40, comparando con las etapas previas (n=5, ANOVA de medidas repetidas, factor tiempo, $p < 0,05$, factor fenotipo: $p < 0,05$. Prueba de comparaciones múltiples de Sidak: LN229 Basal vs LN229 D40: $**p < 0,01$; LN229E1 Basal vs LN229E1 D40: $**p < 0,01$; LN229E1 D25 vs LN229E1 D40: $*p < 0,05$; LN229 D25 frente a LN229 D40: ns).

4.2 Impacto de la disrupción circadiana inducida mediante luz constante en la progresión del GBM

En la sección anterior se demostró que la desregulación del gen *bmal1* en la línea celular LN229, resulta en una peor prognosis y un mayor aumento del volumen tumoral en ratones *nude* macho sin causar modificaciones en los patrones circadianos de los animales. En la siguiente sección evaluaremos si una alteración del sistema circadiano del ratón portador puede tener un efecto similar sobre la progresión y prognosis.

Como modelo de disrupción circadiana a nivel central, los animales fueron expuestos a condiciones de luz constante (LL), las cuales ya se ha demostrado que inducen alargamiento del período seguido de arritmicidad. Se optó por dicho esquema y no por otros (por ejemplo, *jet lag* crónico), debido a que los pacientes que se encuentran en terapia intensiva por diversas patologías (como puede ser por padecer un GBM) son expuestos a luz durante la noche, como ya fue descrito en diversos trabajos (Ver “Introducción” del Capítulo I). Por lo tanto, nos propusimos estudiar el efecto que la luz constante tiene sobre la progresión del GBM *in vivo*.

En primera instancia, se procedió a implantar células LN229 en ratones *nude* macho, y luego del período de recuperación bajo ciclos de LO 12:12, los animales fueron divididos en dos subgrupos; un grupo se mantuvo bajo este esquema de luz,

mientras que el otro fue transferido a condiciones de LL. Se registró el ritmo en el comportamiento locomotor (Figura 3.14 A), para monitorear el alargamiento en el período, y la eventual arritmicidad circadiana de los ratones. Mientras que los ratones expuestos a ciclos LO 12:12 mostraron ritmos de actividad con períodos de 24 h sincronizados con el ciclo, los animales sometidos a LL mostraron un alargamiento típico del período circadiano (25.6 ± 0.15 h) (Figura 3.14 B), pero sin mostrar arritmicidad.

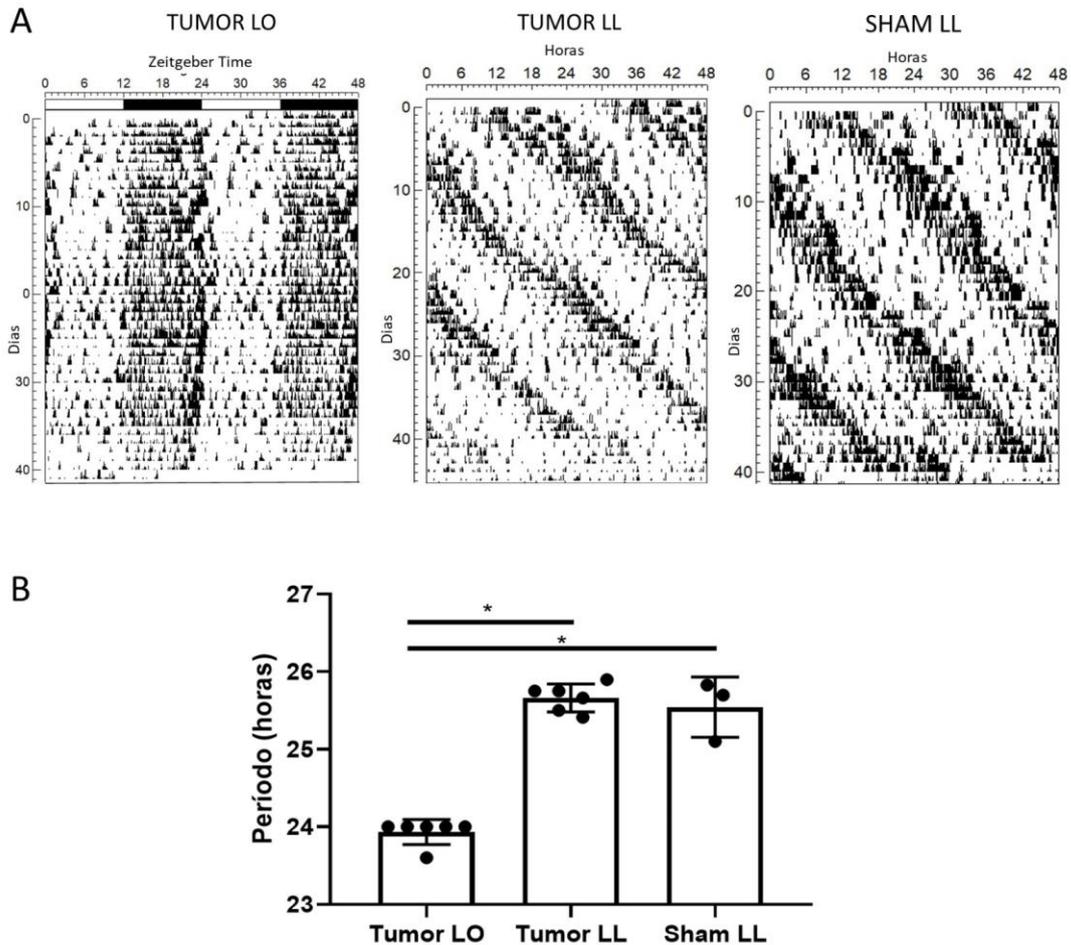


Figura 3.14. Ritmos de actividad locomotora de ratones *nude* implantados con células de GBM (o *sham*) expuestos a ciclos LO 12:12, o a condiciones de luz constante (LL). (A) Actogramas

representativos mostrando algunos efectos de la progresión del GBM en los ritmos circadianos: el panel izquierdo es un individuo que primero pierde su sincronización de 24 h con los ciclos de LO desde el día 25 y luego pierde su ritmo de actividad; el panel central muestra un individuo con GBM expuesto a LL, que pierde su patrón de actividad a partir del día 40. (B) Períodos para cada condición de luz. Los ratones con tumores bajo ciclos LO muestran períodos de $24 \pm 0,05$ h y los animales en LL muestran períodos de $25,6 \pm 0,15$ h (ANOVA de una vía, $p < 0,01$. Prueba de Tukey de comparaciones múltiples. sham LL vs Tumor LL: ns; sham LL vs Tumor LO, $p < 0,001$; Tumor LL vs Tumor LO: $p < 0,001$).

Al comparar la sobrevida de los ratones sometidos a LO o LL, se observó que no se obtienen diferencias significativas entre las dos curvas (prueba de rango logarítmico de Mantel-Cox, ns) (Figura 3.15 A). Sin embargo, al comparar las medianas de sobrevida, se observa que bajo LO poseen una mediana de 60 días (similar a la obtenida en el experimento de progresión LN229 vs LN229E1), mientras que la mediana bajo LL es de 54 días. Estos resultados indican una tendencia a presentar peor prognosis bajo condiciones de LL.

Al comparar los pesos de los ratones entre punto final e inicial, ambos grupos presentan una pérdida de peso debida al GBM, pero no hay diferencias significativas entre ambos, destacándose una mayor dispersión de los datos en el grupo bajo LL. A su vez, se observa que los ratones *sham* no presentan diferencia de peso entre el punto final e inicial, obteniéndose resultados cercanos a 0.

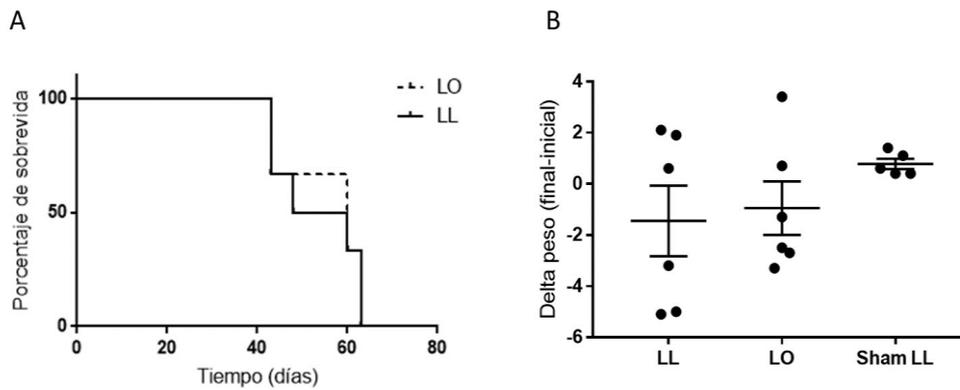


Figura 3.15. Los ratones sometidos a LL y LO no presentan diferencias en la supervivencia. (A) Las curvas de supervivencia de los ratones *nude* sometidos a esquemas LL o LO no presentan diferencias significativas (n=6 prueba de rango logarítmico de Mantel-Cox, ns). Mediana de supervivencia: LO: 60 días; LL: 54 días). (B) Diferencial de pesos de los ratones sometidos a LL o LO, expresado como peso en el punto final menos peso en el punto inicial. No hay diferencias significativas entre ambos fenotipos (Test de t: ns). Se observa que los ratones *sham* no presentan diferencia de peso entre el punto final e inicial, obteniéndose resultados cercanos a 0.

A continuación, se procedió a evaluar el volumen tumoral de los ratones sometidos a ambos esquemas de luz. Se llevaron a cabo mediciones en animales en el día 25 post implantación y en el punto final. No se observaron diferencias significativas en los volúmenes tumorales de los ratones sometidos a ambos esquemas (Figura 3.16 A y C). Las figuras B y D muestran imágenes representativas del volumen tumoral en el día 25 y en punto final. Se evidencia que no hay diferencias en el volumen alcanzado.

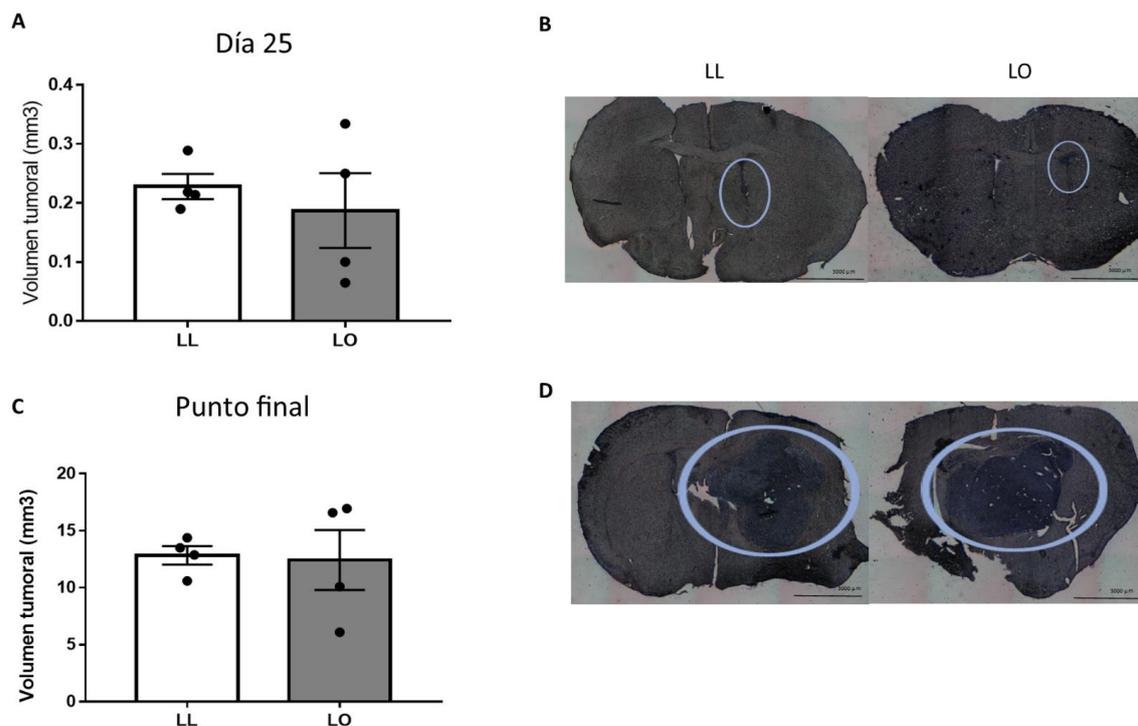


Figura 3.16. El volumen tumoral de los ratones expuestos a ciclos LO o a condiciones de LL no presenta diferencias. (A) volumen tumoral en el día 25 post implante (Test de t, ns, n=4), (C) en el punto final (test de t, ns, n=4). Micrografías representativas de microscopía de campo claro en color (2,5 X) en el día 25 (B), y en punto final (D). El tumor se encuentra resaltado con un círculo azul.

5. Discusión

En el presente capítulo se estudió cómo el reloj circadiano impacta en la proliferación y prognosis del GBM en dos niveles: por un lado, desregulando la actividad del gen *bmal1*, un componente central del reloj molecular de las células tumorales mediante CRISPR/Cas9, y por otro, generando una alteración del reloj circadiano del organismo mediante exposición a luz constante.

El modelo de GBM humano utilizado en esta tesis son las células LN229, sobre las cuales no se había demostrado hasta la fecha si presentaban ritmos circadianos estables. Por lo tanto, se estudió la activación del promotor de *bmal1*

utilizando el plásmido pGL3-Bmal1-dLuc *in vitro*, obteniéndose ritmos significativos de 24 h (Figura 3.1). A su vez, mediante reporteros bioluminiscentes se estudió la expresión de *bmal1* y *per1* tumoral *in vivo*, obteniéndose también ritmos significativos, y demostrando que las células mantienen un reloj circadiano funcional dentro del cerebro de ratones *nude* (Figura 3.2). La expresión máxima de *per2* (ZT18) y *bmal1* (ZT4) en nuestros experimentos, con una resolución temporal de 4 h, se superpone bien con la expresión en otros tejidos cerebrales de ratón. En el núcleo caudado putamen se ha observado que *per2* alcanza su punto máximo temprano en la noche (ZT12-17) (Paul *et al.*, 2019), mientras que en la pituitaria lo hace en ZT14-15, en el tronco encefálico en ZT13, en el cerebelo en ZT15 (Pizarro *et al.*, 2013), y en la corteza cerebral de ratones adultos, también en ZT15 (Shimomura *et al.*, 2001). Por otro lado, *bmal1* alcanza su punto máximo en la pituitaria y en el tronco encefálico en ZT0 (Pizarro *et al.*, 2013). Nuestros resultados son coincidentes, entonces, tanto en el horario del pico, como en el desfase de 6-8 h entre los picos de ambos genes, con los resultados obtenidos para otras áreas cerebrales.

Por lo tanto, el siguiente objetivo fue la generación de un modelo celular de GBM deficiente del mecanismo circadiano, es decir, arrítmico. Teniendo en cuenta que las células LN229 poseen un reloj circadiano, es posible desregularlo a nivel génico. La tecnología CRISPR/Cas9 es utilizada desde hace ya muchos años para generar ediciones genéticas estables, por lo que para llevar adelante un silenciamiento estable del gen *bmal1*, el único gen que genera fenotipos de arritmicidad y disrupción del reloj circadiano (Bunger *et al.*, 2000), se optó por dicha tecnología. Se puso a punto el protocolo para editar las células LN229, obteniéndose así las células LN229E1, arrítmicas tanto en *bmal1* como en *per1*, lo cual fue

corroborado a nivel génico, mediante secuenciación y obtención de una base editada en el exón 2 de *bmal1* en el sitio de reconocimiento de Cas9 (Figura 3.5), y mediante el estudio de la activación del promotor de *bmal1* utilizando el plásmido pGL3-Bmal1-dLuc (Figura 3.6), obteniéndose una pérdida en la ritmicidad. A nivel transcripcional, se evaluaron los niveles de ARNm mediante qPCR de Bmal1 durante 24 h. Si bien ambos genotipos celulares de GBM mostraron niveles rítmicos, las células LN229E1 mostraron una marcada reducción en la amplitud (Figura 3.7). Finalmente, se evaluaron a nivel traduccional los niveles inmunocitoquímicos de BMAL1 y de PER1 cada 4h y a lo largo de 24 h, obteniéndose ritmos circadianos para ambas proteínas en las células LN229, los cuales no se observaron en las LN229E1 (Figura 3.8).

Estos resultados demuestran que fue posible obtener un modelo deficiente del reloj circadiano en las células LN229 de GBM humano.

A continuación, se procedió a evaluar dicho modelo. Dada la comprobada interacción entre el reloj circadiano y el ciclo celular (Matsuo *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2018; Farshadi *et al.*, 2019), se analizó la proliferación de las células LN229E1, observando que las mismas presentan una menor proliferación en comparación con las *wild type* (Figura 3.9), resultados similares a los obtenidos por Wagner y colaboradores, donde utilizando la misma construcción para silenciar *bmal1* en las células T98G de GBM obtuvieron un arresto en la fase G0-G1 (Wagner, datos no publicados).

Posteriormente, ambos tipos celulares fueron implantados ortotópicamente en el núcleo estriado de ratones *nude*, para estudiar el crecimiento tumoral en ambos genotipos *in vivo*. Al evaluar la supervivencia de los ratones, se observó que los

implantados con las células LN229E1 presentaban una menor supervivencia (54 días) que aquellos implantados con las células LN229 (61 días). Es decir, la desregulación del reloj molecular por *knock down* de *bmal1* en las células LN229E1 genera un fenotipo más agresivo de GBM, con una peor prognosis en los ratones huéspedes (Figura 3.10).

Se procedió a evaluar el tamaño tumoral mediante tinción de Nissl, tanto en los días 25 y 40 post implante, como en punto final. Se observó que tanto en el día 25 como en el día 40 post implante, el volumen tumoral es significativamente mayor para los ratones inyectados con LN229E1 (Figura 3.11). Estos resultados demuestran que, si bien poseen menor tasa de proliferación *in vitro* al compararlas con el genotipo *wild type*, los GBMs de las células LN229E1 aceleran su crecimiento generando una peor prognosis *in vivo*, como ya había sido demostrado por Wagner *et al* (2021, y datos sin publicar), en el mismo modelo de inhibición de *bmal1* en células T98G de GBM. En ese sentido, cabe destacar que una línea celular no necesariamente debe tener el mismo comportamiento *in vitro* que *in vivo*. Una menor proliferación *in vitro* no se correlaciona con menor proliferación *in vivo*, ya que los contextos en los cuales se encuentran las células son completamente distintos. Por ejemplo, el aumento en el volumen tumoral en ratones *nude* puede deberse a que las células están proliferando más *in vivo* (algo que debería medirse con un marcador de proliferación específico, como, por ejemplo, ki67) pero a su vez puede deberse a una mayor vascularización, mayor tasa metabólica o mayor interacción pro-tumoral con su microambiente, el cual se encuentra presente solo en el contexto *in vivo*. El Capítulo II de la presente tesis buscará, justamente, responder a esta pregunta analizando la activación del microambiente tumoral en ratones *nude*.

El papel que juegan *bmal1* y los diferentes genes del reloj molecular en la progresión del GBM aún no está claro. Se ha demostrado que BMAL1 suprime la proliferación y la migración en las líneas celulares establecidas U87 (Gwon *et al.*, 2020) y U251 (Jung *et al.*, 2013). De acuerdo con estos resultados, Wagner *et al.* (2021) han demostrado que el silenciamiento de la expresión de *bmal1* está asociada con una forma más agresiva del tumor, utilizando un modelo animal para la neurofibromatosis humana tipo I como modelo de glioma en ratones. Además, se demostró que el silenciamiento de *Reverb*, tanto en líneas celulares como en cultivos de GBM provenientes de biopsias humanas, inhibe la proliferación y migración celular (Yu *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta que *Reverb* es un represor de *bmal1* en el oscilador circadiano molecular, el silenciamiento de *Reverb* conduciría a una mayor expresión de *bmal1*, y por lo tanto a una menor proliferación tumoral, postulando nuevamente a *bmal1* como un gen supresor de tumores.

Por el contrario, en las células madre de GBM, se ha demostrado que *bmal1* promueve la proliferación tumoral. Pang *et al.* demostraron que, al silenciar *bmal1* en un modelo de línea de células madre de glioma, aumentó la supervivencia de los ratones (Pang *et al.*, 2023) y que *CLOCK* es esencial para el mantenimiento del fenotipo de célula madre. Dong *et al.* han demostrado resultados similares, mostrando que el silenciamiento de *bmal1* tiene un impacto en la formación de tumores y aumenta la supervivencia de los ratones (Dong *et al.*, 2019).

Ya ha sido descrito que el papel de *bmal1* como supresor de tumores en GBMs está mediado principalmente por la inhibición de la vía PI3K-Akt, lo cual genera la inhibición de la invasión celular y de la metaloproteínasa 2 (Jung *et al.*, 2013), la ciclina B1 y la metaloproteínasa 9 (Gwon *et al.*, 2020). A su vez, se ha

demostrado que BMAL1 induce de forma directa la expresión de la proteína WEE1 (implicada en la fase M del ciclo celular) (Matsuo *et al.*, 2003) y de Ciclina D (fundamental para la transición M a G1) (Zhang *et al.*, 2018) y B (fundamental para la transición G2 a M) (Farshadi *et al.*, 2019), y de forma indirecta la expresión de p21 (Gréchez-Cassiau *et al.*, 2008), por lo que la ausencia de BMAL1 tiene un impacto directo en el ciclo celular. Es probable que la desregulación de *bmal1* en las células LN229 esté generando, entre otros procesos, desregulación de los controles de este gen reloj sobre el ciclo celular, lo cual resultaría en una mayor proliferación tumoral *in vivo*.

Por otra parte, en células madre de GBM se ha demostrado que el papel del dímero BMAL1: CLOCK como oncogén está mediado por la vía OLFML3-HIF1a-POSTN-TBK1c (Pang *et al.*, 2023), y su ausencia produce arresto del ciclo celular y apoptosis, siendo así indispensable para el mantenimiento del fenotipo de célula madre (Dong *et al.*, 2019). Además, recientemente se ha demostrado que BMAL1 tiene un papel fundamental en el metabolismo energético y la diferenciación de células madre pluripotentes embrionarias (Ameneiro *et al.*, 2020).

Teniendo en cuenta que las células LN229 son una línea celular establecida de GBM, es posible que el papel de *bmal1* en la progresión tumoral tenga un mecanismo similar al ya descrito para U87 y U251, el cual podría estar mediado por la vía PI3K-Akt.

Por otro lado, se procedió a evaluar los ritmos de temperatura de ratones implantados con ambos genotipos celulares y ratones *sham*, tanto en el día 25 y 40 post implante como en punto final. Se obtuvieron ritmos estables de 24 h en la temperatura corporal de los ratones para los tres grupos a lo largo de la progresión,

sin observarse diferencias entre los genotipos, ni con los ratones *sham* (Figura 3.12), obteniéndose patrones similares a los ya reportados (Cohen *et al.*, 2009; Mul Fedele *et al.*, 2020). Los resultados de temperatura y actividad en rueda son coincidentes con lo ya descrito por Duhart y Brocardo *et al.* (2017) quienes demostraron que, si bien ratones *nude* con gliomas hipotalámicos de células LN229 presentan una mayor fragmentación de la actividad, no se observan diferencias significativas en los periodos de actividad ni en la sincronización al ciclo LO 12:12 de los mismos, al comparar con ratones *sham*.

Finalmente, al evaluar la capacidad motora de los ratones se observa que ambos fenotipos presentan una pérdida de coordinación motora, lo cual es típico en la progresión del GBM (Vannini *et al.*, 2017). Sin embargo, los ratones implantados con las células LN229E1 poseen mayor pérdida de la coordinación motora, particularmente en el día 40 post implante, lo cual colabora con la hipótesis de la mayor agresividad de este genotipo (Figura 3.13).

En conjunto, estos resultados muestran que *bmal1* podría estar actuando como gen supresor de tumores en este modelo de GBM. Sin embargo, es necesario seguir investigando la interacción bidireccional entre el reloj circadiano y el cáncer, con el fin de dilucidar los mecanismos específicos de tejido y tumor que regulan la función del reloj en el desarrollo y progresión del GBM.

El siguiente objetivo de este capítulo fue estudiar el efecto de la luz constante en la progresión de GBM. Teniendo en cuenta que la mayoría de los pacientes que se encuentran en terapias intensivas, entre ellos los pacientes con cáncer avanzado, están expuestos a iluminación durante la noche, ya que las visitas médicas ocurren en diversos momentos del día por la dinámica propia de los hospitales y la

organización en turnos rotativos de los médicos y enfermeros (Morag y Ohlsson, 2016), se buscó estudiar el efecto de exposición a luz constante sobre la progresión del GBM. Ya ha sido demostrado que estos esquemas afectan la calidad de sueño de los pacientes (Adell *et al.*, 2021) y la expresión rítmica de los genes reloj, observándose una pérdida de la ritmicidad circadiana en los genes *bmal1*, *per1* y *clock* en muestras de pacientes luego de una semana en terapia intensiva (Díaz *et al.*, 2019). A su vez, se ha demostrado que los esquemas de desincronización circadiana (es decir, el mantenimiento de una relación de fases inestable entre el reloj y el *zeitgeber*), como ocurre bajo un protocolo de jet lag crónico, promueven la progresión tumoral en una variedad de cánceres (Aiello *et al.*, 2020, Filipski *et al.*, 2004, Papagiannakopoulos *et al.*, 2016). Sin embargo, no hay muchos estudios que analicen los efectos de la interrupción por LL, o de la desincronización circadiana por jet lag crónico en animales implantados con GBM. Ratones bajo un esquema de jet lag crónico mostraron un perfil transcriptómico con una desregulación de genes de GBM relacionado con genes circadianos (Khan *et al.*, 2019), así como en vías cancerosas/metabólicas (Khan *et al.*, 2021) en la corteza prefrontal y el núcleo accumbens. Con respecto a GBM y LL, sólo un estudio analizó dicho efecto, observando que promueve el metabolismo anabólico cuando se estudian modelos de gliomas subcutáneos heterotópicos en ratas (Guerrero-Vargas *et al.*, 2017).

Al exponer a ratones implantados con células LN229 a ciclos LO, o a condiciones de LL, estos últimos mostraron un alargamiento del período como se esperaba (Período bajo LD: 24 ± 0.05 h, Período bajo LL: 25.6 ± 0.15 h) (Maroni *et al.*, 2018; Rumanova *et al.*, 2020), y alteraciones del ritmo de actividad bajo LO cuando el tumor progresa, como ya se ha descrito (Duhart *et al.*, 2017).

No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento tumoral o en la supervivencia (Figuras 3.15 y 3.16). Sin embargo, se observó una tendencia en la mediana de supervivencia, siendo menor en los ratones expuestos a LL. Es posible que dicha tendencia no sea significativa por el tamaño muestral de los experimentos (n=6). Es necesario repetir estos experimentos incrementando la potencia estadística para terminar de definir si la tendencia se vuelve significativa, o si efectivamente los esquemas de luz constante no están afectando la progresión de este modelo de GBM. En ese sentido, cabe mencionar que también es posible que no se evidencien diferencias significativas dado que los ratones implantados y expuestos a LL no mostraron patrones de actividad arrítmicos, lo cual indicaría que los NSQ continúan manteniendo su coherencia intrínseca y la de sus salidas fisiológicas (Ohta *et al.*, 2005), más allá de las diferencias esperadas en el periodo con respecto a los ratones en LO 12:12.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos, puede concluirse que en este modelo de GBM, el reloj molecular estaría actuando como un factor importante que impacta en la progresión y en la prognosis tumoral, mientras que el alargamiento del periodo evidenciado por el ciclo LL no estaría, *a priori*, impactando en ese sentido en este modelo

6. Resumen del Capítulo

En el presente capítulo se obtuvieron los siguientes resultados:

- Las células LN229 de GBM humano presentan un reloj circadiano funcional, tanto *in vitro* como *in vivo*.
- Es posible desregular la actividad de dicho reloj en las células LN229 mediante la edición génica de *bmal1*, utilizando CRISPR/Cas9.
- Al ser implantadas en el cerebro de ratones *nude*, las células LN229E1 deficientes de *bmal1* desarrollan GBMs que presentan una velocidad de crecimiento mayor, una peor prognosis, y una disminución en la supervivencia de los ratones.
- Las células LN229E1 generan una mayor pérdida de la coordinación motora, en correlación con la velocidad de desarrollo del tumor.
- Los ratones implantados con ambos tipos celulares presentan ritmos circadianos normales de temperatura corporal a lo largo de la progresión tumoral.
- Los ratones expuestos a luz constante no presentan peor prognosis ni mayor velocidad de crecimiento tumoral que los expuestos a ciclos LO. Sin embargo, se observa una tendencia hacia una menor mediana de supervivencia.

Bibliografía del Capítulo I

Abdraboh ME, *et al.* (2022) 'Constant light exposure and/or pinealectomy increases susceptibility to trichloroethylene-induced hepatotoxicity and liver cancer in male mice.' *Environ Sci Pollut Res Int.* 29(40):60371-60384. doi: 10.1007/s11356-022-19976-4.

Aiello I, *et al.* (2020). Circadian disruption promotes tumor-immune microenvironment remodeling favoring tumor cell proliferation. *Sci Adv.* 6(42):eaaz4530. doi: 10.1126/sciadv.aaz4530.

Aiello I, *et al.* (2021) 'Circadian disruption induced by tumor development in a murine model of melanoma.' *Chronobiol Int.* 39(1):12-25. doi: 10.1080/07420528.2021.1964519.

Ameneiro C, *et al.* (2020) 'BMAL1 coordinates energy metabolism and differentiation of pluripotent stem cells'. *Life Sci Alliance.* 3(5):e201900534. doi: 10.26508/lsa.201900534.

Anisimov VN, *et al.* (2012) 'Light-at-night-induced circadian disruption, cancer and aging'. *Curr Aging Sci.* 5(3):170-7. doi: 10.2174/1874609811205030002.

Arafa A, Eshak ES, Iso H, Muraki I, Tamakoshi A. (2021). Night Work, Rotating Shift Work, and the Risk of Cancer in Japanese Men and Women: The JACC Study. *J Epidemiol.* 31(12):585-592. doi: 10.2188/jea.JE20200208.

Baggs JE, *et al.* (2009). 'Network features of the mammalian circadian clock'. *PLoS Biol.*;7(3):e52. doi: 10.1371/journal.pbio.1000052.

Balsalobre, A., Damiola, F. and Schibler, U. (1998) 'A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells', *Cell*. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81199-X.

Bernat Adell MD, *et al.* (2021) 'Factors affecting sleep quality in Intensive Care Units'. *Med Intensiva (Engl Ed)*. 45(8):470-476. doi: 10.1016/j.medine.2021.08.011.

Bunger MK, *et al* (2000). 'Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals'. *Cell*. 103(7):1009-17. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00205-1.

Bunger MK, *et al.* (2005). 'Progressive arthropathy in mice with a targeted disruption of the Mop3/Bmal-1 locus'. *Genesis*. 41(3):122-32. doi: 10.1002/gene.20102.

Chinoy ED, Duffy JF, Czeisler CA (2018). 'Unrestricted evening use of light-emitting tablet computers delays self-selected bedtime and disrupts circadian timing and alertness'. *Physiol Rep*. (10):e13692. doi: 10.14814/phy2.13692.

Cohen R, Smale L, Kronfeld-Schor N. (2009) 'Plasticity of circadian activity and body temperature rhythms in golden spiny mice'. *Chronobiol Int*. 26(3):430-46. doi: 10.1080/07420520902820939.

Dang JJ, *et al.* (2023) 'Association of outdoor artificial light at night exposure with overweight and obesity among children and adolescents aged 9 to 18 years in China'. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 55(3):421-428. Chinese. doi: 10.19723/j.issn.1671-167X.2023.03.006.

Diaz E, *et al.* (2020) 'Clock Genes Disruption in the Intensive Care Unit'. *J Intensive Care Med.* 35(12):1497-1504. doi: 10.1177/0885066619876572.

Dong Z, *et al.* (2019) 'Targeting Glioblastoma Stem Cells through Disruption of the Circadian Clock'. *Cancer Discov.* 9(11):1556-1573. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0215.

Duhart JM y Brocardo L, *et al.* (2017) 'Circadian Alterations in a Murine Model of Hypothalamic Glioma'. *Front Physiol.* 8:864. doi: 10.3389/fphys.2017.00864.

Farshadi E, *et al.* (2019) 'The positive circadian regulators CLOCK and BMAL1 control G2/M cell cycle transition through Cyclin B1'. *Cell Cycle.*

Farshadi E, *et al.* (2019) 'The positive circadian regulators CLOCK and BMAL1 control G2/M cell cycle transition through Cyclin B1'. *Cell Cycle.*

Filipski, E., *et al.*, (2004) 'Effects of chronic jet lag on tumor progression in mice'. *Cancer Res.* 64(21): p. 7879-85.

Fonken LK, *et al.* (2010) 'Light at night increases body mass by shifting the time of food intake.' *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(43):18664-9. doi: 10.1073/pnas.1008734107.

Gale JE, *et al.* (2011) 'Disruption of circadian rhythms accelerates development of diabetes through pancreatic beta-cell loss and dysfunction'. *J Biol Rhythms.* 26(5):423-33. doi: 10.1177/0748730411416341.

Gréchez-Cassiau A, *et al.* (2008) 'The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21 WAF1/ CIP1 expression and hepatocyte proliferation'. *J Biol Chem.*

Guerrero-Vargas NN, *et al.* (2017). 'Circadian disruption promotes tumor growth by anabolic host metabolism; experimental evidence in a rat model'. *BMC Cancer*. 17(1):625. doi: 10.1186/s12885-017-3636-3.

Gwon DH, *et al.* (2020) '*BMAL1* Suppresses Proliferation, Migration, and Invasion of U87MG Cells by Downregulating Cyclin B1, Phospho-AKT, and Metalloproteinase-9'. *Int J Mol Sci*.21(7):2352. doi: 10.3390/ijms21072352.

Heckman CJ, Kloss JD, Feskanich D, Culnan E, Schernhammer ES (2017). Associations among rotating night shift work, sleep and skin cancer in Nurses' Health Study II participants. *Occup Environ Med*. 74(3):169-175. doi: 10.1136/oemed-2016-103783.

Jung CH, *et al.* (2013) '*Bmal1* suppresses cancer cell invasion by blocking the phosphoinositide 3-kinase-Akt-MMP-2 signaling pathway'. *Oncol Rep*. 29(6):2109-13. doi: 10.3892/or.2013.2381.

Kettner NM, *et al* (2016). 'Homeostasis of Liver Metabolism Suppresses Hepatocarcinogenesis'. *Cancer Cell*.

Khan S, *et al.* (2019). 'Impact of chronically alternating light-dark cycles on circadian clock mediated expression of cancer (glioma)-related genes in the brain'. *Int J Biol Sci*. 15(9):1816-1834. doi: 10.7150/ijbs.35520.

Khan S, Yong VW, Xue M (2021). 'Circadian disruption in mice through chronic jet lag-like conditions modulates molecular profiles of cancer in nucleus accumbens and prefrontal cortex'. *Carcinogenesis*. 42(6):864-873. doi: 10.1093/carcin/bgab012.

Kiessling S, *et al.* (2017) 'Enhancing circadian clock function in cancer cells inhibits tumor growth'. *BMC Biol.*

Kim, W., Kang, B.R., Kim, H.Y. *et al.* (2015) 'Real-time imaging of glioblastoma using bioluminescence in a U-87 MG xenograft model mouse'. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 58, 243–248. <https://doi.org/10.1007/s13765-015-0037-7>

Korkmaz T, *et al.*, (2018). 'Opposite Carcinogenic Effects of Circadian Clock Gene BMAL1'. *Sci Rep.*

Kyba C.C.M., Mohar A., Posch T (2017). 'How bright is moonlight?' *Astron. Geophys.* 58:31–32. doi: 10.1093/astrogeo/atx025.

Magno LAV, Collodetti M, Tenza-Ferrer H, Romano-Silva MA (2019) 'Cylinder Test to Assess Sensory-motor Function in a Mouse Model of Parkinson's Disease'. *Bio Protoc.* 9(16):e3337. doi: 10.21769/BioProtoc.3337.

Mann NP, *et al.* (1986) 'Effect of night and day on preterm infants in a newborn nursery: randomised trial'. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 293(6557):1265-7. doi: 10.1136/bmj.293.6557.1265.

Maroni MJ, *et al.* (2018). 'Constant light alters serum hormone levels related to thyroid function in male CD-1 mice'. *Chronobiol Int.* 35(10):1456-1463. doi: 10.1080/07420528.2018.1488259.

Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H (2003). Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* (80-).

Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* (80-). 2003

Mieda M, *et al.* (2015). 'Cellular clocks in AVP neurons of the SCN are critical for interneuronal coupling regulating circadian behavior rhythm'. *Neuron.*;85(5):1103-16. doi: 10.1016/j.neuron.2015.02.005.

Morag I, Ohlsson A (2016). 'Cycled light in the intensive care unit for preterm and low birth weight infants'. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016(8):CD006982. doi: 10.1002/14651858.CD006982.pub4.

Mul Fedele ML, *et al.* (2020). 'Differential Thermoregulatory and Inflammatory Patterns in the Circadian Response to LPS-Induced Septic Shock'. *Front Cell Infect Microbiol.* 10:100. doi: 10.3389/fcimb.2020.00100.

Murakami A, *et al.* (2000) 'Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice'. *Cancer Res.* 60(18):5059-66.

Mustonen AM, Nieminen P, Hyvärinen H (2002). 'Effects of continuous light and melatonin treatment on energy metabolism of the rat'. *J Endocrinol Invest.* 25(8):716-23. doi: 10.1007/BF03345106.

Ohta H, Yamazaki S, McMahon DG (2005). 'Constant light desynchronizes mammalian clock neurons'. *Nat Neurosci.* 8(3):267-9. doi: 10.1038/nn1395

Pang L, *et al.* (2023). 'Circadian regulator CLOCK promotes tumor angiogenesis in glioblastoma'. *Cell Rep.* 42(2):112127. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112127.

Papagiannakopoulos T, *et al.* (2016) 'Circadian Rhythm Disruption Promotes Lung Tumorigenesis'. *Cell Metab.*

Paul JR, Davis JA, Goode LK, *et al* (2019). 'Circadian Regulation of Membrane Physiology in Neural Oscillators Throughout the Brain'. *Eur J Neurosci.* 10.1111/ejn.14343. doi:10.1111/ejn.14343.

Pizarro A, Hayer K, Lahens NF, Hogenesch J (2013). 'CircaDB: a database of mammalian circadian gene expression profiles'. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue):D1009-1013. doi:10.1093/nar/gks1161.

Qian J, *et al.* (2015). 'Circadian Disruption and Diet-Induced Obesity Synergize to Promote Development of β -Cell Failure and Diabetes in Male Rats'. *Endocrinology.* 156(12):4426-36. doi: 10.1210/en.2015-1516.

Qiu P, *et al.* (2019). 'BMAL1 knockout macaque monkeys display reduced sleep and psychiatric disorders'. *Natl Sci Rev.* 6(1):87-100. doi: 10.1093/nsr/nwz002.

Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J (2009). 'siRNA vs. shRNA: similarities and differences'. *Adv Drug Deliv Rev.*61(9):746-59. doi: 10.1016/j.addr.2009.04.004.

Rich, C, Longcore, T. (2005) 'Ecological Consequences of Artificial Night Lighting'. ISBN: 9781559631297.

Rumanova VS, Okuliarova M, Zeman M (2020). 'Differential Effects of Constant Light and Dim Light at Night on the Circadian Control of Metabolism and Behavior'. *Int J Mol Sci.* 21(15):5478. doi: 10.3390/ijms21155478.

Russell WC, Newman C, Williamson DH (1975) 'A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses'. *Nature.* 253(5491):461-2. doi: 10.1038/253461a0. PMID: 46112.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012). 'NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis'. *Nature Methods.* doi: 10.1038/nmeth.2089.

Shimomura H, Moriya T, Sudo M, et al (2001). 'Differential daily expression of Per1 and Per2 mRNA in the suprachiasmatic nucleus of fetal and early postnatal mice'. *European Journal of Neuroscience.* 13(4):687-693. doi:10.1046/j.0953-816x.2000.01438.x

Singh V, Braddick D, Dhar PK (2017). 'Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology'. *Gene.* 30;599:1-18. doi: 10.1016/j.gene.2016.11.008.

Fu L, et al. (2002). 'The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo'. *Cell.*

Sulli G, et al. (2018). 'Pharmacological activation of REV-ERBs is lethal in cancer and oncogene-induced senescence'. *Nature.* 553(7688):351-355. doi: 10.1038/nature25170.

Tchekalarova J, et al. (2018). 'Agomelatine treatment corrects symptoms of depression and anxiety by restoring the disrupted melatonin circadian rhythms of

rats exposed to chronic constant light'. *Pharmacol Biochem Behav.* 171:1-9. doi:10.1016/j.pbb.2018.05.016.

Trebucq LL, *et al.* (2021). 'Timing of Novel Drug 1A-116 to Circadian Rhythms Improves Therapeutic Effects against Glioblastoma'. *Pharmaceutics.* 13(7):1091. doi: 10.3390/pharmaceutics13071091.

Vannini E, *et al.* (2017) 'Progression of motor deficits in glioma-bearing mice: impact of CNF1 therapy at symptomatic stages'. *Oncotarget.*8(14):23539-23550. doi: 10.18632/oncotarget.15328.

Vásquez-Ruiz S, *et al.* (2014) 'A light/dark cycle in the NICU accelerates body weight gain and shortens time to discharge in preterm infants'. *Early Hum Dev.* 90(9):535-40. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2014.04.015.

Vetter C, Juda M, Lang D, Wojtysiak A, Roenneberg T. (2011). 'Blue-enriched office light competes with natural light as a zeitgeber'. *Scand J Work Environ Health.* 37(5):437-45. doi: 10.5271/sjweh.3144.

Wagner PM, *et al.* (2019) 'Proliferative Glioblastoma Cancer Cells Exhibit Persisting Temporal Control of Metabolism and Display Differential Temporal Drug Susceptibility in Chemotherapy'. *Mol Neurobiol.* 56(2):1276-1292. doi: 10.1007/s12035-018-1152-3.

Wagner PM, *et al.* (2021) 'Temporal regulation of tumor growth in nocturnal mammals: In vivo studies and chemotherapeutical potential. *FASEB J.* 35(2):e21231. doi: 10.1096/fj.202001753R. PMID: 33428275.

Wagner PM, Monjes NM, Guido ME (2019). 'Chemotherapeutic Effect of SR9009, a REV-ERB Agonist, on the Human Glioblastoma T98G Cells'. *ASN Neuro*. 11:1759091419892713. doi: 10.1177/1759091419892713.

Yaping W, *et al.* (2017). 'Upregulation of circadian gene "hClock" contribution to metastasis of colorectal cancer'. *Int J Oncol*.

Yu M, Li W, Wang Q, Wang Y, Lu F (2018). 'Circadian regulator NR1D2 regulates glioblastoma cell proliferation and motility'. *Oncogene*. 37(35):4838-4853. doi: 10.1038/s41388-018-0319-8.

Zhang Y, *et al.* (2018) 'Dosing time dependent in vitro pharmacodynamics of Everolimus despite a defective circadian clock'. *Cell Cycle*.

Capítulo II.

Interacción entre el reloj circadiano y el microambiente tumoral del glioblastoma

1. Introducción

1.1. El microambiente tumoral del glioblastoma

Los glioblastomas se originan y progresan en un ambiente particular, el cerebro. Por lo tanto, su progresión no se da de forma aislada, sino que se encuentran rodeados de una diversidad de células que normalmente se encuentran presentes en dicho órgano, como neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía, las cuales constituyen el microambiente tumoral. Ha sido demostrado que tanto la microglía como los astrocitos poseen un rol fundamental en el desarrollo del glioblastoma (Gieryng *et al.*, 2017), y que, en ratones, entre el 30 y el 50% de la masa tumoral se encuentra formada por macrófagos y microglía asociados al tumor (GAMs, por sus siglas en inglés; Roggendorf *et al.*, 1996). Allí la microglía adopta un fenotipo del tipo pro-tumoral, produciendo factores que promueven la proliferación del GBM, como el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) y la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) (Olah *et al.*, 2011; García *et al.*, 2014). Sumado a esto, el GBM tiene la posibilidad de evadir al sistema inmune produciendo factores inmunosupresores y promoviendo fenotipos del tipo pro-tumoral en la microglía (Zhang *et al.*, 2015), generándose de esta manera una interacción bidireccional entre el GBM y la microglía, capaz de fomentar la proliferación tumoral.

Además, el glioblastoma produce factores que activan a los astrocitos, convirtiéndolos en lo que se conoce como “astrocitos reactivos”. Los astrocitos son células sumamente heterogéneas que pueden tener diferentes comportamientos

dependiendo del estado de salud o enfermedad. La reactividad de los astrocitos es un proceso que ocurre cuando estas células atraviesan cambios morfológicos, moleculares y funcionales en respuesta a lesiones, infecciones y enfermedades (Escartin *et al.*, 2021), proceso que durante muchos años se pensó que era pasivo, pero en las últimas décadas ha demostrado ser fundamental para responder a lesiones y enfermedades del SNC (Sofroniew, 2020). Pueden definirse dos tipos de astrocitos reactivos: astrocitos reactivos proliferativos de los bordes, y astrocitos reactivos no proliferativos (Sofroniew, 2020). El primer grupo se caracteriza por rodear el tejido dañado y contener infiltración de leucocitos, proceso que ocurre típicamente después de un trauma, una isquemia o una infección. Este tipo de astrocitos son esenciales para regenerar la barrera hematoencefálica alrededor de lesiones y para proteger y preservar el tejido neuronal funcional adyacente (Burda y Sofroniew, 2014; Bush *et al.*, 1999). Con respecto a los astrocitos no proliferativos, son células que responden a lesiones o enfermedades, pero manteniendo sus características fundamentales de estructura celular, interacciones y funciones (Sofroniew y Vinters, 2010). En ese sentido, se han detectado astrocitos reactivos en el microambiente de tumores cerebrales, los cuales se destacan por una diversidad en la expresión de determinadas proteínas, entre las cuales se encuentran la proteína glial fibrilar ácida (GFAP, por sus siglas en inglés), CD276 y CD274 (Heiland *et al.*, 2019), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Roessler *et al.*, 1995) y un subgrupo que posee expresión del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3, por sus siglas en inglés), con alta capacidad metastásica (Priego *et al.*, 2018). Es importante destacar que no existe un único marcador de expresión que dé cuenta de la reactividad de los astrocitos, por lo tanto, se elaboró un consenso por el cual se sugiere elegir al menos dos marcadores a la

hora de evaluar la reactividad de un astrocito (Escartin *et al.*, 2021), entre los cuales se destacan GFAP, S100B, y nestina.

Teniendo en cuenta lo antes expuesto, ya ha sido demostrada la interacción entre las células de GBM y los astrocitos del microambiente, observándose particularmente una gran cantidad de astrocitos reactivos en los espacios peritumorales. Al analizar tejido de pacientes, se han observado cantidades significativas de astrocitos no tumorales adyacentes a la masa tumoral, los cuales se encuentran en un fenotipo reactivo expresando grandes cantidades de GFAP (Gagliano *et al.*, 2009). De hecho, Irvin *et al.* (2017) demostraron que los astrocitos reactivos pueden expresar distintos tipos de proteínas, las cuales determinan la transformación de los astrocitos hacia un determinado tipo tumoral: mientras que los astrocitos transformados positivos para el transportador de glutamato/L-aspartato (GLAST, por sus siglas en inglés) tienden a dar lugar a astrocitomas de grado I y II (bajo grado), aquellos que son positivos para la proteína GFAP tienden a dar lugar a astrocitomas de grado III y IV (como los glioblastomas).

En este microambiente tumoral se da una interacción bidireccional, donde el GBM libera una serie de factores que convierten a los astrocitos en reactivos y, a su vez, los astrocitos liberan una serie de factores que promueven la proliferación tumoral. Dentro de estos factores, puede mencionarse la comunicación indirecta mediada por vesículas extracelulares, las cuales son producidas por ambos tipos celulares y contienen miARNs, citoquinas y quimiocinas que colaboran en generar reactividad en los astrocitos peritumorales (Oushy *et al.*, 2018) y en promover la proliferación del GBM (Yang *et al.*, 2017). Por ejemplo, se ha demostrado que los astrocitos liberan IL-6, la cual promueve la liberación de metaloproteasa 2 (MMP2)

en las células de GBM (Chen *et al.*, 2016), IL-1, que activa a los astrocitos e induce la ruptura de la barrera hematoencefálica, promoviendo la migración de las células tumorales (Guan *et al.*, 2018), y quimiocinas como el factor 1 derivado de células estromales (SDF-1), también conocido como ligando 12 de quimiocina del motivo CXC (CXCL12), el cual activa la proliferación del GBM (Barbero *et al.*, 2002). Dentro de las moléculas que los astrocitos liberan para colaborar con el crecimiento tumoral, pueden nombrarse también el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-1, por sus siglas en inglés), la proteína quimioatrayente de monocitos 4 (MCP-4, por sus siglas en inglés) y la interleuquina 19 (IL-19), entre otros (Chen *et al.*, 2016).

Sin embargo, la comunicación indirecta mediada por vesículas no es la única que ocurre entre los astrocitos y el GBM. Existe una comunicación directa mediada, por un lado, por las uniones gap que se forman entre el GBM y los astrocitos (Zhang *et al.*, 1999), como la proteína canal conexina 43 (Cx43) (Theodoric *et al.*, 2012) y, por otro, por los nanotubos túnel (Zhang y Zhang, 2015), que facilitan el pasaje de metabolitos de un tipo celular al otro.

Se evidencia entonces que existe una interacción de las células del microambiente con el GBM, la cual es bidireccional, donde el tumor promueve fenotipos pro-tumorales en las células que lo rodean, y las células del microambiente secretan factores que colaboran en la proliferación y migración. Algunos de los factores implicados en estas interacciones se resumen en la Figura 3.1.

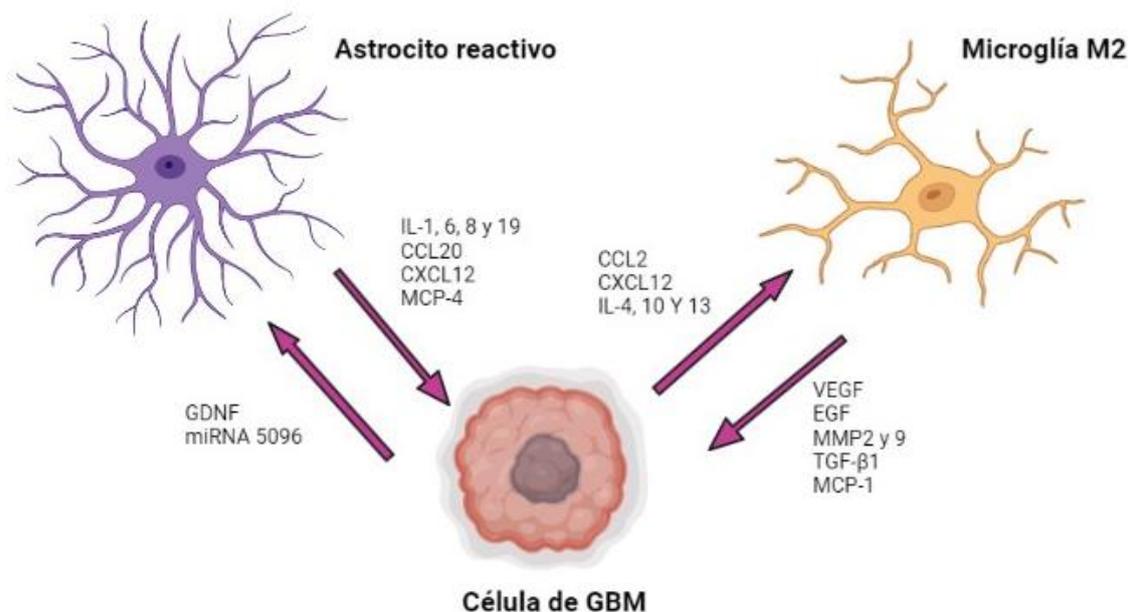


Figura 3.1: interacción entre los astrocitos, la microglía y las células de GBM. Las células de GBM liberan factores que vuelven a los astrocitos reactivos como el miARN 5096 y el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, por sus siglas en inglés). Por su parte, los astrocitos se vuelven reactivos y liberan factores que promueven la proliferación y migración tumoral, como las citoquinas IL-1, 6, 8 y 19, las quimiocinas CCL20 y CXCL12 y el factor MCP-4. Por su parte, para tener un fenotipo del tipo M2 en la microglía y evadir al sistema inmune, el GBM produce las citoquinas IL-4, 10 y 13 y las quimiocinas CCL2 y CXCL12, lo cual genera un fenotipo inmunosupresor. A su vez, la microglía comienza a producir MCP-1 y TGF-β1, fomenta la migración del GBM produciendo MMP2 y MMP9, y la proliferación al producir VEGF y el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés).

Esta interacción que se da entre el GBM y la neuroglía del microambiente impacta en la agresividad del tumor, y, por ende, en la prognosis. A los marcadores de GBM ya mencionados anteriormente (ver “Introducción General”) se le suman una serie de marcadores que han sido descritos en los últimos años, los cuales, a su vez, están asociados a la interacción del GBM con su microambiente. Dentro de

estos marcadores, pueden mencionarse a la proteína 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2 lisina procolágeno (PLOD-2, por sus siglas en inglés), CD99 y CD44, quienes se encuentran río abajo de PLOD-2. Particularmente, se ha demostrado que PLOD-2 promueve una transformación tumoral en los neutrófilos asociados al GBM del microambiente (Kreße *et al.*, 2022). Sin embargo, CD44 es, dentro de esta vía, uno de los marcadores de prognosis más utilizados en GBM, el cual correlaciona con agresividad y baja supervivencia, observándose menor expresión de CD44 en los astrocitomas de grados bajos (Dzobo *et al.*, 2020; Hou *et al.*, 2019). Trabajos recientes han demostrado que la expresión de CD44 en las células de GBM modula el microambiente, generando inmunosupresión y un fenotipo del tipo M2 en los macrófagos asociados al tumor (Xiao *et al.*, 2021). Por otro lado, cuando se llevó a cabo la activación de células U87 (modelo de GBM) con medios condicionados de astrocitos, se observó una mayor expresión de CD44 (Du *et al.*, 2022).

Por lo tanto, es importante detectar, analizar y estudiar estos marcadores asociados al microambiente, como CD44, ya que dan una idea de la agresividad de un tumor y de su interacción con las células normales.

1.2. El microambiente del GBM y el reloj circadiano

La interacción entre el microambiente tumoral y el reloj circadiano es un tema que comenzó a estudiarse con mayor profundidad en la última década. Ya ha sido demostrado que diversos genes del reloj circadiano tumoral se encuentran implicados en la interacción del tumor con su microambiente, colaborando con la generación de un microambiente pro-tumoral o anti-tumoral, dependiendo del tipo de tumor y del contexto (Aiello *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2019; Zeng *et al.*, 2022).

Particularmente, en GBM estas interacciones han comenzado a estudiarse en mayor profundidad en los últimos años.

Tanto Chen *et al* (2020) como Xuan *et al* (2022) han demostrado que el gen circadiano *clock* recluta microglía inmunosupresora en células madre de glioma, y que la inhibición de este gen reduce este tipo de microglía y prolonga la supervivencia general en ratones. Además, recientemente se demostró que el gen *bmal1* promueve la angiogénesis a través del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) (Wang *et al.*, 2021) en tejidos humanos de GBM, y que CLOCK también promueve la angiogénesis en células madre (Pang *et al.*, 2023). Sin embargo, mientras que el papel del reloj circadiano en el control de la microglía se empieza a describir en profundidad, la reactividad de los astrocitos y su dependencia del reloj circadiano no ha sido aún estudiada en GBM.

1.3. Modelos de estudio del microambiente del GBM

El estudio del microambiente del GBM se ha realizado mediante distintos enfoques. Por un lado, cuando estas interacciones se modelan *in vitro*, las técnicas más utilizadas son los co-cultivos indirectos y directos. Los primeros consisten en estudiar el comportamiento de las células del GBM frente a la adición de medios condicionados de algún tipo celular del microambiente, por ejemplo, astrocitos o microglía. Por lo tanto, ambos tipos celulares se cultivan en placas, y se procede a colectar el medio condicionado de los astrocitos o de la microglía, generalmente luego de 24 o 48 h para dar suficiente tiempo a que las células liberen factores al medio, y el mismo se adiciona al cultivo de células de GBM (Jing *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2020). De esta manera, se evalúa la respuesta de las células, midiendo, por

ejemplo, procesos como proliferación y migración, frente a un medio condicionado que posee una serie de factores solubles (lo cual se conoce como comunicación paracrina), entre los que se cuentan citoquinas, quimiocinas y vesículas producidas por las células del microambiente (Chekhonin *et al.*, 2018). Esta técnica también permite realizar la activación de forma inversa, agregando medio condicionado de células de GBM a los astrocitos, para analizar si los mismos se vuelven reactivos y adoptan un fenotipo del tipo pro-tumoral (Oushy *et al.*, 2018).

Otra estrategia es llevar a cabo co-cultivos directos, donde las células del GBM y del microambiente se cultivan de forma conjunta. Este tipo de cultivos permiten, además de evaluar la interacción mediante factores solubles, evaluar las interacciones directas del GBM con el microambiente, como las uniones gap (Vis *et al.*, 2020). Sin embargo, dado que ambos procesos ocurren conjuntamente, no permiten una distinción entre la interacción célula a célula y la interacción paracrina, por lo tanto, para distinguir entre ambos procesos siempre es conveniente realizar tanto co-cultivos indirectos como directos (Chekhonin *et al.*, 2018).

Por otro lado, la manera más directa de modelizar la interacción entre las células tumorales y la neuroglia peri-tumoral en el microambiente del GBM es mediante modelos *in vivo*, realizando implantes ortotópicos de glioma y estudiando dichas interacciones. Estas técnicas proporcionan un modelo más completo desde el punto de vista holístico, ya que representan de mejor manera las interacciones que ocurren en un GBM. Sin embargo, son más caros y complicados de llevar adelante (Žavbi y Breznik, 2021; Sharma *et al.*, 2023).

En el presente capítulo estudiaremos la interacción del reloj circadiano tumoral con el microambiente, analizando tanto la reactividad de los astrocitos como

la expresión del marcador de prognosis CD44 en las células tumorales. Este análisis se llevará a cabo *in vitro*, mediante co-cultivos indirectos, e *in vivo*, en un modelo ortotópico de glioma

2. Hipótesis y Objetivos

El reloj circadiano influye en la remodelación del microambiente tumoral, donde los genes reloj pueden actuar como activadores o inhibidores de los fenotipos reactivos en los astrocitos y los fenotipos inmunosupresores en la microglía, generando de esta manera ambientes pro-tumorales o anti-tumorales. Por lo tanto, **bajo la hipótesis que la actividad del reloj circadiano remodela el microambiente del GBM**, el objetivo general del presente capítulo fue evaluar dicho rol en la interacción entre el tumor y el microambiente del GBM, usando como modelo a las células LN229. Por un lado, a nivel molecular, estudiar el efecto de alteraciones genéticas de *bmal1* en la célula tumoral sobre esta interacción. Por el otro, a nivel del sistema circadiano del hospedador, mediante un modelo de disrupción del reloj por luz constante, teniendo como objetivos específicos los siguientes:

Caracterizar el efecto circadiano que poseen medios condicionados de astrocitos sobre la proliferación y expresión del marcador de prognosis CD44 en células LN299 y LN229E1.

- Caracterizar el efecto circadiano que poseen medios condicionados de células tumorales LN229 y LN229E1 sobre la proliferación de astrocitos.
- Determinar el rol del reloj molecular de las células tumorales en la expresión del marcador de prognosis CD44, y en la expresión de marcadores de reactividad de los astrocitos (GFAP, nestina) del microambiente tumoral, comparando GBMs generados por xenotransplantes de células LN229 o LN229E1 en ratones *nude*.

- Evaluar las consecuencias de la disrupción circadiana por luz constante en la expresión del marcador de prognosis CD44 en las células tumorales y en la expresión de marcadores de reactividad de los astrocitos (GFAP, nestina) del microambiente de GBMs generados por xenotransplantes de células LN229 en ratones *nude*.

3. Materiales y metodología

Experimentos *in vitro*

3.1. Cultivo celular

3.1.1. Cultivos primarios de astrocitos

Se utilizaron los cerebros de 4 ratones C57BL/6J neonatos de 1-5 días de edad por cultivo, los cuales fueron extraídos en un gabinete de flujo laminar y mantenidos en PBS frío hasta su disección. Luego de remover cuidadosamente las meninges, el tejido (cerebro completo) fue colocado en DMEM y disociado con tijera y bisturí. Posteriormente, la suspensión conteniendo los trozos de tejido fue pasada por una pipeta Pasteur de vidrio para disgregarlos mecánicamente, hasta lograr homogeneidad. La solución fue centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante, y el pellet fue resuspendido en medio DMEM F12 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). La suspensión celular se sembró en una botella de cultivo de 75 cm² de superficie conteniendo medio DMEM suplementado con 10% de SFB, y antibiótico-antimicótico. Dos días más tarde se realizó un cambio de medio, para remover las células que no sobrevivieron a la preparación. El cultivo se mantuvo en DMEM 10% SFB con antibiótico-antimicótico a 37°C y 5% CO₂ y se realizaron cambios de medio cada 3 días. Una vez que los cultivos alcanzaron confluencia (aproximadamente 10-14 días), se procedió a realizar el método de McCarthy para enriquecer los astrocitos en los cultivos (McCarthy, 1980). Para ello, el frasco conteniendo las células fue agitado durante 30 minutos a 150 rpm y 37 °C, para eliminar la microglía. El medio fue descartado y se colocó DMEM F12 nuevo. Posteriormente, se agitó el cultivo durante 6 h a 200 rpm y 37°C, para eliminar los oligodendrocitos. Finalmente, las células que se mantuvieron adheridas a la placa

fueron repicadas y plaqueadas nuevamente en un nuevo frasco T75. Una vez que las células alcanzaron confluencia (7-10 días), se repicaron y se sembraron en las placas correspondientes según el experimento. Para corroborar que los cultivos contenían mayormente astrocitos, se llevó a cabo un marcado inmunocitoquímico de la proteína GFAP, utilizando 1/5000 del anticuerpo monoclonal anti GFAP (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) y posterior incubación con el anticuerpo secundario Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU). Posteriormente, se llevó a cabo una tinción con DAPI (Sigma) para observar los núcleos y se procedió a la observación del cultivo en el equipo Cytation 5, objetivos de 2,5x y 10x, y canales DAPI y de GFP.

Las células fueron sincronizadas y mantenidas en todos los experimentos según lo indicado en los “Materiales y Métodos generales”.

3.2. Experimentos con medios condicionados

3.2.1. Preparación del DMEM con SFB

Teniendo en cuenta que el SFB posee una serie de factores que pueden actuar como activadores en las células (entre ellos, vesículas), primeramente, se procedió a deplecionar el medio DMEM para utilizarlo en los experimentos de medios condicionados. Para ello, se lo centrifugó con 50% SFB a 28.000 rpm durante 18 h a 4 °C (ultracentrífuga Rotor tipo 45 Ti, Beckman Coulter, EE.UU.), como ya fue indicado en Vilas Shelke *et al.*, (2014), eliminando de esta manera las vesículas y otros factores, y conservando el sobrenadante para los experimentos. El mismo fue posteriormente diluido con DMEM, dependiendo de la necesidad de cada experimento.

3.2.2. Evaluación de la proliferación de astrocitos y células tumorales (LN229 y LN229E1) frente a la adición de medios condicionados.

En una placa de 6 *wells*, se plaquearon 200.000 células/*well* de astrocitos, LN229 o LN229E1. A su vez, en una placa de 96 *wells* se plaquearon 2.500 células/*well* de astrocitos, LN229 o LN229E1. Se esperó 16 h para que las células se adhirieran, y se las sincronizó cada 4 h, durante 24 h a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 HPS. Luego de la sincronización, se esperaron 24 h para que las células condicionen el medio, se procedió a colectarlo de las placas de 6 *wells* conteniendo cada tipo celular para cada punto horario, y se los centrifugó a 5000 rpm durante 5 min para eliminar células que pudieran encontrarse suspendidas. Luego de esto, se procedió a tratar con los medios condicionados a las células de la placa de 96 *wells*, con correspondencia en los HPS, adicionando inmediatamente luego de ser colectados, y previa remoción del DMEM de cada *well*. Por lo tanto, las células recibieron medio condicionado según las tablas 3 y 4, en las cuales, a su vez, se indica su procedencia. La figura 4.1 resume el protocolo experimental.

Astroцитos 0 HPS con medio condicionado de LN229 0 HPS	Astroцитos 4 HPS con medio condicionado de LN229 4 HPS	Astroцитos 8 HPS con medio condicionado de LN229 8 HPS	Astroцитos 12 HPS con medio condicionado de LN229 12 HPS	Astroцитos 16 HPS con medio condicionado de LN229 16 HPS	Astroцитos 20 HPS con medio condicionado de LN229 20 HPS	Astroцитos 24 HPS con medio condicionado de LN229 24 HPS
Astroцитos 0 HPS con medio condicionado de LN229E1 0 HPS	Astroцитos 4 HPS con medio condicionado de LN229E1 4 HPS	Astroцитos 8 HPS con medio condicionado de LN229E1 8 HPS	Astroцитos 12 HPS con medio condicionado de LN229E1 12 HPS	Astroцитos 16 HPS con medio condicionado de LN229E1 16 HPS	Astroцитos 20 HPS con medio condicionado de LN229E1 20 HPS	Astroцитos 24 HPS con medio condicionado de LN229E1 24 HPS

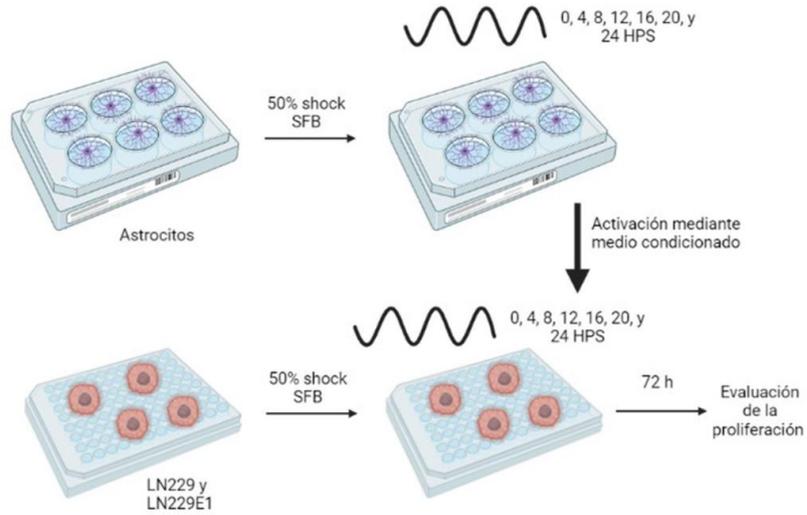
Tabla 3. Esquemas de medios condicionados recibidos por los astroцитos.

LN229 0 HPS con medio condicionado de Astrocytes 0 HPS	LN229 4 HPS con medio condicionad o de Astrocytes 4 HPS	LN229 8 HPS con medio condicionado de Astrocytes 8 HPS	LN229 12 HPS con medio condicionad o de Astrocytes 12 HPS	LN229 16 HPS con medio condicionad o de Astrocytes 16 HPS	LN229 20 HPS con medio condicionad o de Astrocytes 20 HPS	LN229 24 HPS con medio condicionado de Astrocytes 24 HPS
LN229E1 0 HPS con medio condicionado de Astrocytes 0 HPS	LN229E1 4 HPS con medio condicionad o de Astrocytes 4 HPS	LN229E1 8 HPS con medio condicionado de Astrocytes 8 HPS	LN229E112 HPS con medio condicionad o de Astrocytes 12 HPS	LN229E1 16 HPS con medio condicionad o de Astrocytes 16 HPS	LN229E1 20 HPS con medio condicionad o de Astrocytes 20 HPS	LN229E1 24 HPS con medio condicionado de Astrocytes 24 HPS

Tabla 4. Esquemas de medios condicionados recibidos por las células de GBM LN229 y

LN229E1.

A



B

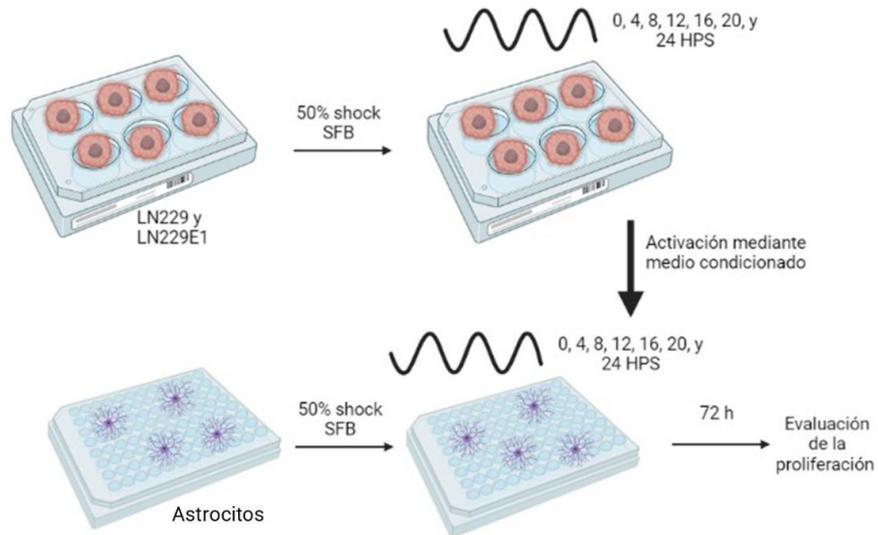


Figura 4.1. Esquema experimental con medios condicionados. (A) Experimento en donde a las células LN229E1 y LN229 se les adiciona medio condicionado de astrocitos. (B) Experimento en donde a los astrocitos se les adiciona medio condicionado de las células LN229 y LN229E1.

A su vez, se realizaron controles negativos sin medio condicionado (con adición de DMEM completo normal) para todos los horarios y todos los tipos celulares. Luego de 72 h, se procedió a teñir a las células con cristal violeta 0.1%, determinando la absorbancia a 595 nm en el Cytation 5.

3.2.3. Evaluación de la expresión de CD44 en LN229 y LN229E1 frente a la adición de medios condicionados de astrocitos (co-cultivos indirectos).

Se plaquearon 3.000 células/*well* (LN229 o LN229E1) en una placa de 96 *wells* y 200.000 células/*well* de astrocitos en una placa de 6 *wells*. Se esperó 16 h a que las células se adhiran, y luego de esto las mismas fueron sincronizadas en dos horarios, 4 y 16 HPS, los cuales se seleccionaron teniendo en cuenta los resultados del experimento de proliferación con medios condicionados (Ver sección Resultados 4.2.2). Se esperaron 24 h para que las células condicionen el medio, y posteriormente se procedió a colectar el medio condicionado de las placas de 6 *wells* para cada punto horario, y se centrifugaron los mismos (a 5000 rpm durante 5 minutos) para eliminar células que pudieran encontrarse suspendidas. Luego de esto, se procedió a tratar con medio condicionado a las células de la placa de 96 *wells*, con correspondencia en los HPS. Por lo tanto, las células LN229E1 y LN229 sincronizadas en 4 y 16 HPS recibieron medio condicionado de los astrocitos sincronizados en 4 y 16 HPS, respectivamente. A su vez, se realizaron controles sin medio condicionado (con adición de DMEM completo normal) para ambos horarios y tipos celulares. Luego de 1 h, se procedió a evaluar la expresión de CD44 mediante inmunocitoquímica, marcando a ambos tipos celulares con 1/1000 del anticuerpo monoclonal CD44, seguido de una incubación con el anticuerpo secundario Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Posteriormente, se llevó a cabo una tinción con DAPI (Sigma, EE. UU.) para observar los núcleos y se

procedió a la observación de los cultivos en el equipo Cytation 5, con objetivos de 2,5x y 10x, y canales DAPI y GFP. Los datos obtenidos en Unidades relativas de fluorescencia (RFU, por sus siglas en inglés) para GFP fueron normalizados a los datos en RFU para DAPI, de manera tal de eliminar el sesgo que la cantidad de células puede introducir en la medida de expresión de CD44.

3.3. Optimización de los marcadores a ser utilizados en los experimentos *in vivo*

Para asegurarse de que la marca de CD44 sea solo expresada por las células tumorales y que GFAP sea solo expresada por los astrocitos, como ya fue descrito en bibliografía (Ver “Introducción” del Capítulo II), se llevaron a cabo tinciones inmunohistoquímicas en las células. Se plaquearon 2.500 cel/*well* de astrocitos, LN229 o LN229E1 en placas de 96 *wells*, y se llevaron a cabo las inmunohistoquímicas, marcando a todos los tipos celulares con 1/5000 del anticuerpo monoclonal anti GFAP (Thermo Fisher scientific, EE. UU.) o 1/1000 del anticuerpo monoclonal CD44, seguido de una incubación con el anticuerpo secundario Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Posteriormente, se llevó a cabo una tinción con DAPI (Sigma) para observar los núcleos y se procedió a la observación de los cultivos en el equipo Cytation 5, con objetivos de 2,5x y 10x, y canales DAPI y GFP.

Experimentos *in vivo*

3.4. Inmunohistoquímica

Para llevar a cabo el análisis de los marcadores de pronóstico tumoral y del microambiente, se eligieron los siguientes marcadores: CD44, como marcador de pronóstico tumoral de las células de GBM, y nestina y GFAP, como marcadores de

reactividad de los astrocitos del microambiente. Dichas evaluaciones se llevaron a cabo a lo largo de la progresión del GBM, sacrificando a los ratones el día 25, el día 40 y en el punto final. Las inmunohistoquímicas se llevaron a cabo siguiendo lo descrito en “Materiales y Métodos generales”, utilizando anticuerpos primarios (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) para nestina (dilución 1/400), GFAP (1/5000), CD44 (1/400), y el anticuerpo secundario Anti-Conejo Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Las mediciones se realizaron con un lector de imágenes Cytation 5, objetivos de 2,5x y 10x, y canales DAPI y GFP.

3.5. Análisis de resultados

3.5.1 Adquisición y procesamiento de imágenes

Las imágenes sin procesar se adquirieron y unieron automáticamente con el *software* GEN 5 en el sistema Cytation 5 y se procesaron con el *software* de análisis de imágenes Fiji (Schneider, Rasband y Eliceiri, 2012).

Las imágenes de inmunohistoquímica fueron analizadas estableciendo una región de interés en todo el tumor, luego se estableció un umbral y se midió la densidad integrada. Para las mediciones de CD44, la densidad integrada corresponde a la fluorescencia dentro del tumor. Para GFAP y nestina, la densidad integrada corresponde a la fluorescencia fuera del tumor, teniendo en cuenta que LN229 no tiene fluorescencia de GFAP y la fluorescencia de nestina es muy baja. Para cada imagen, los valores del *background* (es decir, una región de interés en el cuerpo estriado izquierdo sin tumor) se restaron de los valores de densidad integrados.

3.5.2. Análisis estadístico.

Para analizar la significancia estadística de los datos, se realizaron las pruebas paramétricas: prueba t de Student, ANOVA de una vía, ANOVA de dos vías y ANOVA tres vías, considerando significativas a un $p < 0.05$.

Para los datos derivados de los experimentos de proliferación con medios condicionados, la presencia de ritmos circadianos fue evaluada mediante la función Meta2d, como se indica en “Materiales y métodos generales”. Los demás análisis estadísticos fueron realizados siguiendo lo indicado en “Materiales y métodos generales”.

4. Resultados

4.1. Caracterización de los cultivos primarios de astrocitos.

Una vez obtenido el protocolo que dio mejores resultados, se procedió a realizar una inmunocitoquímica con GFAP para determinar la cantidad de astrocitos presentes en el cultivo final. El porcentaje de células GFAP positivas fue siempre superior al 85%, en todos los cultivos testeados (Figura 5.1 A y B).

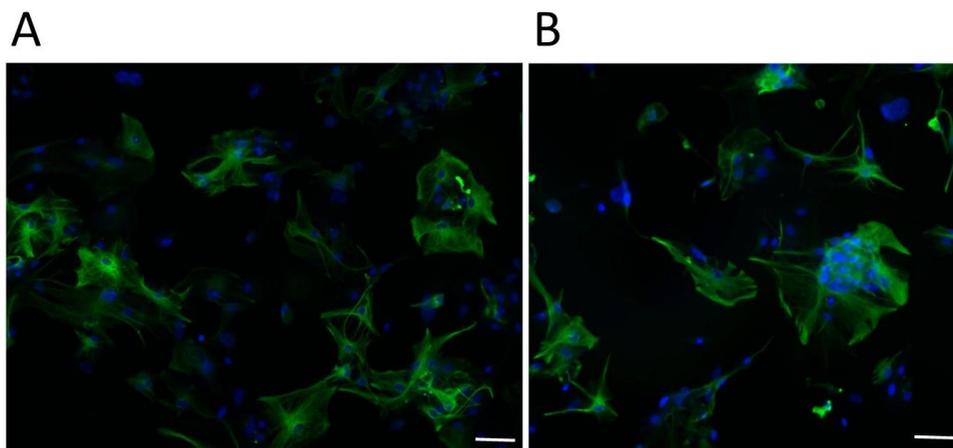


Figura 5.1: Imágenes representativas (10x) obtenidas con el sistema Cytation 5, de cultivos primarios de astrocitos con expresión de GFAP (verde) y DAPI (azul). Las barras de escala representan 20 μm .

4.2. Experimentos con medios condicionados

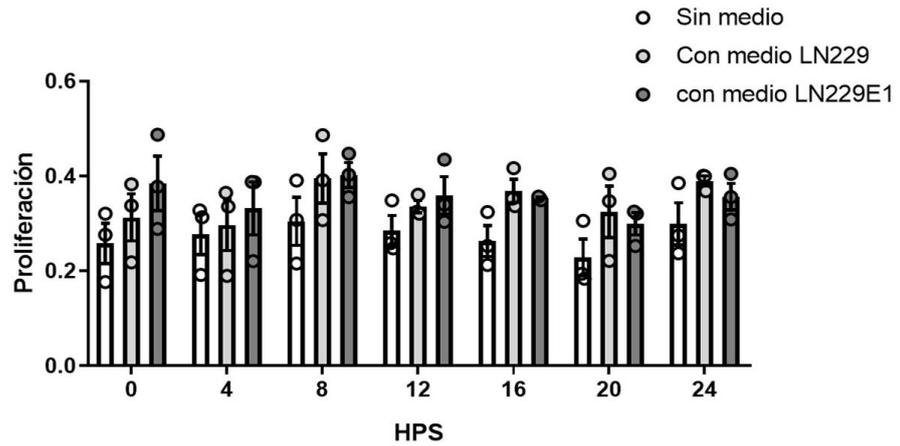
4.2.1. Evaluación de la proliferación de astrocitos y células tumorales (LN229 y LN229E1) frente a la adición de medios condicionados.

Para comprender la interacción que ocurre en el microambiente entre los astrocitos y las células de GBM a nivel paracrino, se llevaron a cabo co-cultivos indirectos con medios condicionados. Se buscó evaluar si los metabolitos que las

células (astrocitos o células de GBM) liberan a sus medios de cultivo actúan sobre la proliferación de las células tumorales o de los astrocitos.

En primera instancia, se adicionó medio condicionado a los astrocitos, tanto de las células LN229 como de las LN229E1 en distintos HPS, observándose que los mismos presentan mayor proliferación cuando se les adiciona el medio condicionado de las células tumorales, independientemente de su genotipo (ANOVA de dos vías, factor Medio, $p < 0.05$, factor genotipo, ns, Figura 5.2 A). Cabe destacar que, dado que los astrocitos poseen una baja proliferación en cultivo, si bien las diferencias son significativas, las mismas son pequeñas, dependiendo del HPS evaluado. No se presentó un ritmo circadiano en la proliferación en respuesta al medio condicionado (Figura 5.2 B, JTK: ns, LS: ns, meta2d: ns), siendo igual para el medio condicionado proveniente de ambos fenotipos tumorales, demostrando que la presencia o ausencia de un reloj circadiano en la célula tumoral no estaría afectando la proliferación de los astrocitos, cuando esta se evalúa mediante co-cultivos indirectos.

A



B

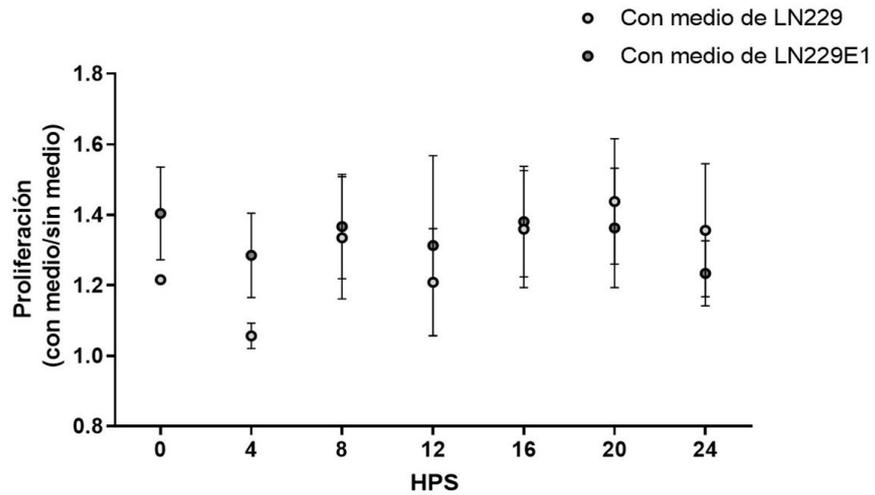


Figura 5.2: La proliferación de los astrocitos aumenta frente al agregado de medio condicionado de células LN229 y LN229E1. (A) Proliferación de los astrocitos en 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 HPS luego de 72 h con el medio condicionado de células LN229 o LN229E1 (n=3, ANOVA de dos vías, factor Medio $p < 0.05$). (B) Proliferación relativa (proliferación con medio/proliferación sin medio) de los astrocitos en 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 HPS luego de 72 h con el medio condicionado de células LN229 o LN229E1 (n=3, ANOVA de dos vías, ns).

Al adicionar medio condicionado de los astrocitos a las células tumorales (tanto a las LN229 como las LN229E1) en distintos HPS, se observó un ritmo en la respuesta de proliferación en las células LN229, con un máximo en 12 HPS, el cual

no estuvo presente en las células LN229E1 (Figura 5.3 A, LN229: JTK: $p < 0.01$, LS: ns, meta2d: $p < 0.01$. LN229E1: JTK: ns, LS: ns, meta2d: ns). Por otro lado, cuando se compara la proliferación de las células LN229 con o sin medio condicionado de los astrocitos, se observa que las células proliferan más al crecer con el medio condicionado (Figura 5.3 B, ANOVA de dos vías, factor tiempo: $p < 0.05$, factor Medio: $p < 0.05$). Sin embargo, cuando se analizan las células LN229E1, se observa que no hay diferencias significativas en la proliferación con y sin medio condicionado (Figura 5.3 C, ANOVA de dos vías, ns), indicando que las células LN229E1 pierden la respuesta proliferativa frente al agregado de medio condicionado de los astrocitos. Finalmente, si se compara la proliferación de las células LN229 con la de las células LN229E1 sin el agregado del medio condicionado (Figura 5.3 D, ANOVA de dos vías, factor fenotipo: $p < 0.05$), se evidencia una menor proliferación de las células LN229E1 para todos los HPS, corroborando lo ya demostrado en el Capítulo I (ver Figura 3.3).

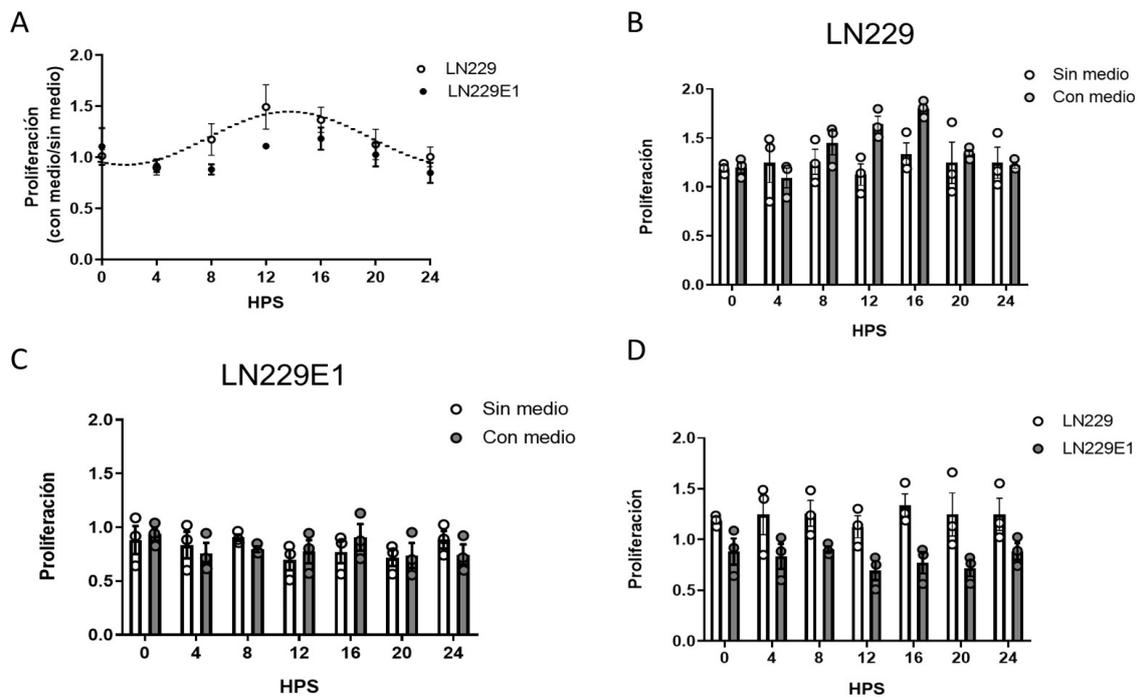


Figura 5.3. Las células LN229, pero no las LN229E1, aumentan su proliferación en respuesta al medio condicionado de astrocitos de forma dependiente del HPS. (A) Proliferación relativa (proliferación con medio/proliferación sin medio) de las células LN229 y LN229E1 en 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 HPS luego de 72 h con el medio condicionado de células LN229 o LN229E1. Se observa un ritmo circadiano en la respuesta al medio condicionado en las células LN229 ($n=3$, media \pm EEM, LN229: JTK: $p<0.01$, LS: ns, meta2d: $p<0.01$. LN229E1: JTK: ns, LS: ns, meta2d: ns. La línea punteada indica el ajuste promedio). (B) Proliferación de células LN229 con medio y sin medio condicionado de astrocitos, a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 HPS (ANOVA de dos vías, factor tiempo: $p<0.05$, factor Medio: $p<0.05$). (C) Proliferación de células LN229E1 con medio y sin medio condicionado de astrocitos, a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 HPS ($n=3$, ANOVA de dos vías, ns). (D) Proliferación de las células LN229 y LN229E1 sin medio condicionado a las a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 HPS ($n=3$, ANOVA de dos vías, factor fenotipo: $p<0.05$).

4.2.2. Evaluación de la expresión de CD44 en LN229 y LN229E1 frente a la adición de medios condicionados de astrocitos

En la sección previa, se evidenció en las células LN229 un ritmo circadiano en la respuesta proliferativa a medios condicionados de astrocitos, y además, que las células LN229E1 pierden esta respuesta frente a dichos medios condicionados. Para continuar analizando estos genotipos, se procedió a cuantificar la expresión de CD44 tanto en las células LN229 como en las LN229E1 frente al agregado de medios condicionados de astrocitos. Los experimentos se llevaron a cabo en dos horarios: 4 HPS (cercano al mínimo de proliferación obtenido), y 16 HPS (cercano al máximo de proliferación) (ver la Figura 5.3).

Se evidencia que las células LN229 presentan una mayor expresión de CD44 luego del agregado de medio condicionado a las 16 HPS, y no se observan efectos a las 4 HPS. Por otro lado, las células LN229E1 no modifican la expresión de CD44, ni por el agregado de medio condicionado de astrocitos, ni dependiendo del HPS. Por lo tanto, se evidencia que las células LN229 varían su expresión de CD44 frente a la activación con el medio condicionado, y de una forma dependiente del horario (Figura 5.4 A, ANOVA de tres vías, factor tipo celular: $p < 0.01$, factor medio x tiempo: $p < 0.05$, factor medio: ns), efecto que se pierde en células con un reloj circadiano deficiente. Cabe destacar que, si bien se observa una tendencia hacia una menor expresión de CD44 en las células LN229E1 de forma basal (es decir, sin medio condicionado) al compararlas con las células LN229, dicha tendencia no es significativa. Las figuras 5.4 B y C muestran imágenes representativas de las células LN229E1 y LN229 respectivamente, expresando CD44 y DAPI.

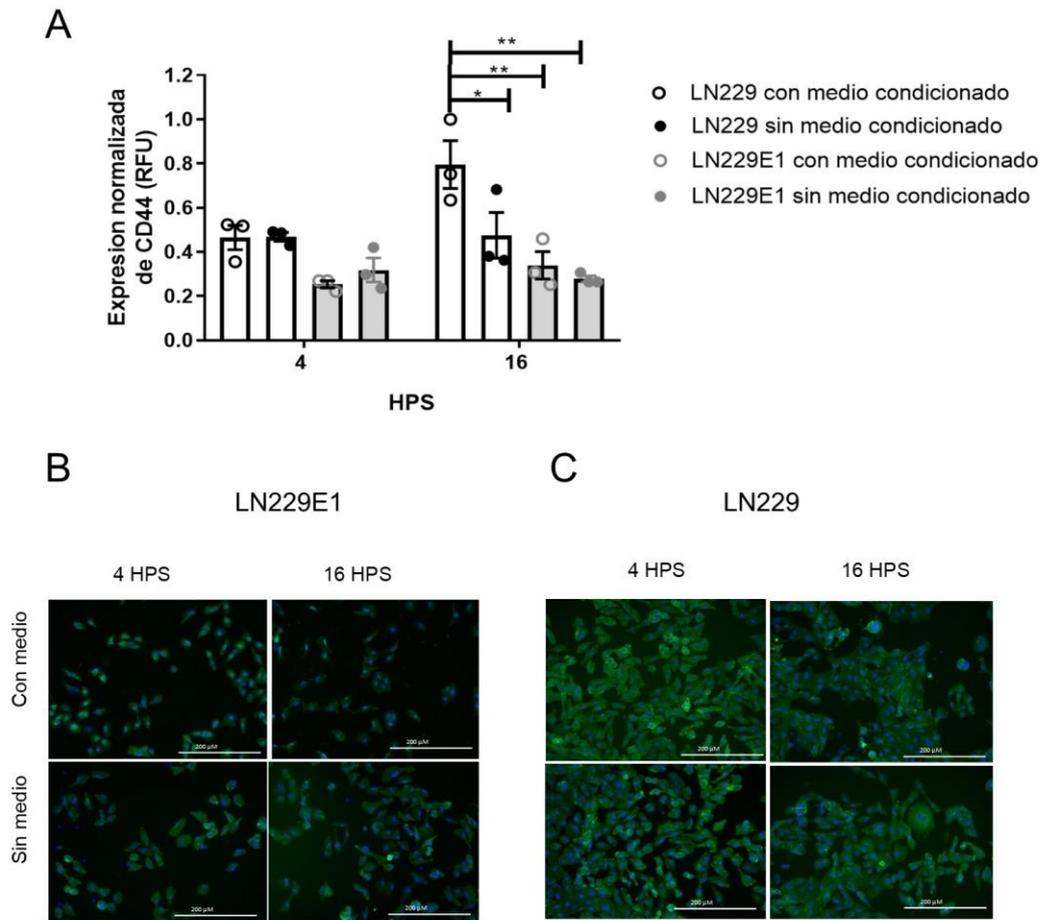


Figura 5.4. Las células LN229, pero no las LN229E1, expresan más CD44 frente al agregado de medios condicionados de astrocitos. Expresión diferencial del marcador de pronóstico CD44 frente al agregado de medios condicionados de astrocitos en 4 y 16 HPS en las células LN229 y LN229E1. (A) La expresión de CD44 frente al agregado de medios condicionados es diferente dependiendo del genotipo y del horario circadiano (n=3, ANOVA de tres vías. Factor tipo celular: $p < 0.01$, factor medio x tiempo: $p < 0.05$. Factor medio: ns), siendo mayor en las células LN229 en 16 HPS (Test de comparaciones múltiples de Sidak: LN229 16 HPS con medio vs LN229 16 HPS sin medio: $p < 0.05$; LN229 16 HPS con medio vs LN229E1 16 HPS con medio: $p < 0.01$; LN229 16 HPS con medio vs LN229E1 16 HPS sin medio: $p < 0.01$). (B) Imágenes representativas (10 x) de las células LN229E1 en 4 y 16 HPS, con o sin medio condicionado, expresando CD44 (verde) y DAPI (azul). (C) Imágenes representativas (10x) de las células LN229 en 4 y 16 HPS, con o sin medio condicionado, expresando CD44 (verde) y DAPI (azul). Las líneas de escala representan $200 \mu\text{m}$.

4.3. Puesta a punto de los marcadores a ser utilizados en los experimentos *in vivo*.

Ya ha sido descrito que las células LN229 no poseen expresión de una diversidad de marcadores típicos de astrocitos, como GFAP. Por otro lado, ya se ha demostrado que CD44 es un marcador de prognosis en GBM (ver “Introducción” del Capítulo II), pero su expresión en astrocitos se encuentra mayormente circunscripta a estadios tempranos del desarrollo y a células precursoras de astrocitos (Dzwonek y Wilczynski, 2015). Para corroborar lo ya descrito en bibliografía, se llevaron a cabo inmunocitoquímicas de GFAP y de CD44 en las células LN229 y en cultivos primarios de astrocitos. En la figura 5.5 se observan imágenes representativas para las marcaciones de astrocitos, LN229 y LN229E1 para GFAP y CD44. Se observa claramente que las células de GBM LN229 y LN229E1 no poseen marca para GFAP, mientras que los astrocitos poseen una clara marcación para dicha proteína. Con respecto a CD44, tanto ambos tipos celulares de GBM como los astrocitos presentan marca, siendo esta más difusa en los astrocitos.

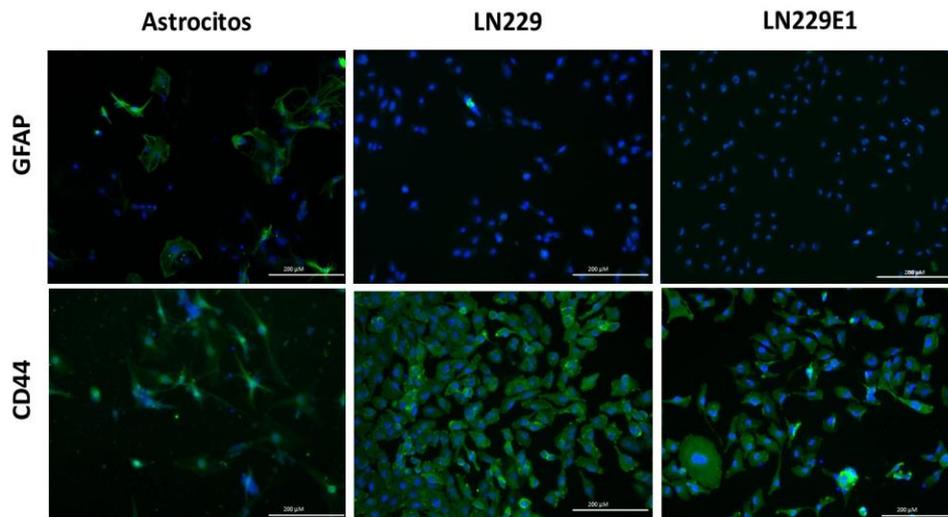


Figura 5.5. Imágenes representativas de inmunocitoquímicas (2.5x) para GFAP (verde) y CD44 (azul) en astrocitos, LN229 y LN229E1.

4.4. Evaluación de la expresión de CD44 en GBM y de la reactividad de astrocitos en ratones *nude* implantados con células LN229 y LN229E1.

Ya ha sido demostrado que CD44 se encuentra sobreexpresada en la mayoría de los GBM, actuando como marcador de prognosis y promotor de la formación de tumores a través de interacciones con el microambiente tumoral (ver la “Introducción” del Capítulo II). Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el Capítulo I respecto a la supervivencia y al tamaño tumoral de ratones implantados con células LN229 y LN229E1, nuestro objetivo fue estudiar la expresión de CD44 en ratones desarrollando GBMs, para analizar si se evidencian diferencias en su expresión frente a la ausencia de un reloj tumoral en las células LN229E1.

La expresión de CD44 se evaluó en cortes de cerebro obtenidos los días 25, 40 y en punto final para cada genotipo. Se observó que la expresión de CD44 (medida como densidad integrada) aumentó a lo largo del protocolo, siendo mayor en el punto final que en los días 25 y 40 (ANOVA de dos vías, factor tiempo: $p < 0,001$. Día 25 vs punto final: $p < 0,01$; día 40 vs punto final: $p < 0,05$) como es de esperarse en un tumor en crecimiento. Además, la expresión de CD44 fue significativamente mayor en los ratones implantados con LN229E1 el día 25 (Figura 5.6 A), mientras que esta diferencia no fue significativa en el día 40 (Figura 4.6 B) ni en el punto final (Figura 5.6 C). Las micrografías tumorales representativas (Figura 5.6 D) muestran claramente la expresión diferencial de CD44 en el tumor el día 25. Estos resultados sugieren que la desregulación de *bmal1* aumenta la expresión de CD44 en las primeras etapas de la progresión de GBM, lo que agrega evidencia al fenotipo (compuesto por un mayor crecimiento tumoral y disminución de la supervivencia general) de este modelo de alteración circadiana de GBM.

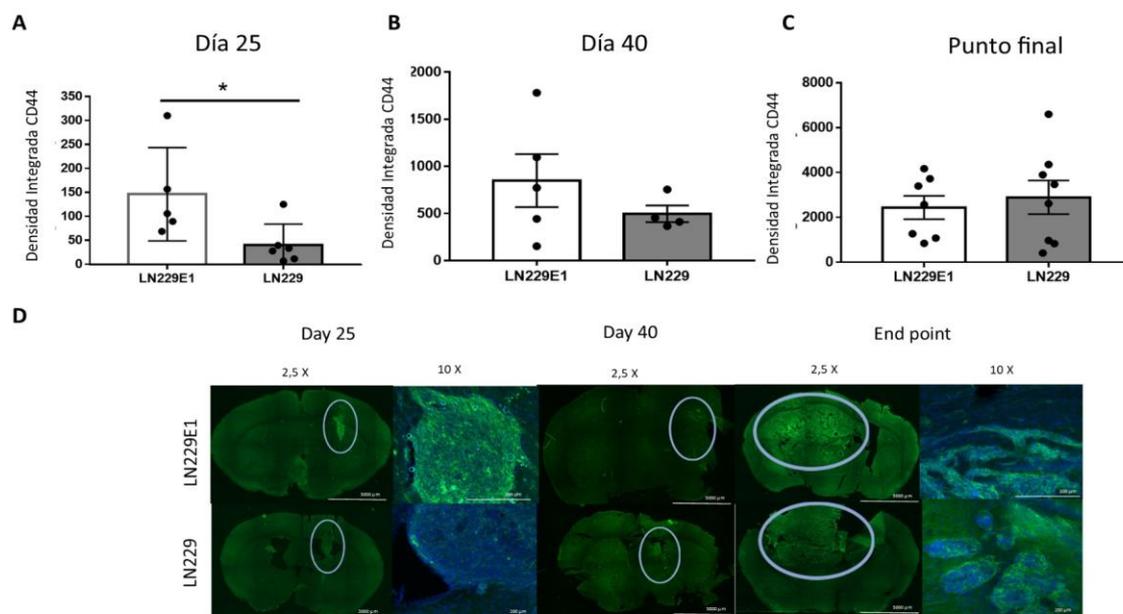


Figura 5.6 La expresión de CD44 en ratones con GBMs LN229E1 es mayor en el día 25 post implantación. Expresión de CD44 (mostrada como densidad integrada) de ratones implantados con células LN2299 o LN229E1, cuantificada el día 25 (A) (n=5, T-test no pareado, *p<0,05), el día 40 (B) (n=5, T-test no pareado, ns), y en punto final (C) (n=8, T-test no pareado, ns). (D) Micrografías representativas de cortes cerebrales (2,5 y 10 X) para el día 25, el día 40 y el punto final. El área del tumor está resaltada con un círculo azul.

A continuación, nos propusimos analizar si la ausencia de *bmal1* genera diferencias en la activación de los astrocitos peri-tumorales del microambiente. Medimos dos marcadores de reactividad ya establecidos, GFAP y nestina, alrededor de ambos tipos celulares implantados en ratones. Teniendo en cuenta que las células LN229 y LN229E1 no expresan GFAP *in vitro* (Figura 5.5), e *in vivo* se observaron resultados similares, es posible separar la expresión de este marcador en astrocitos y GBM.

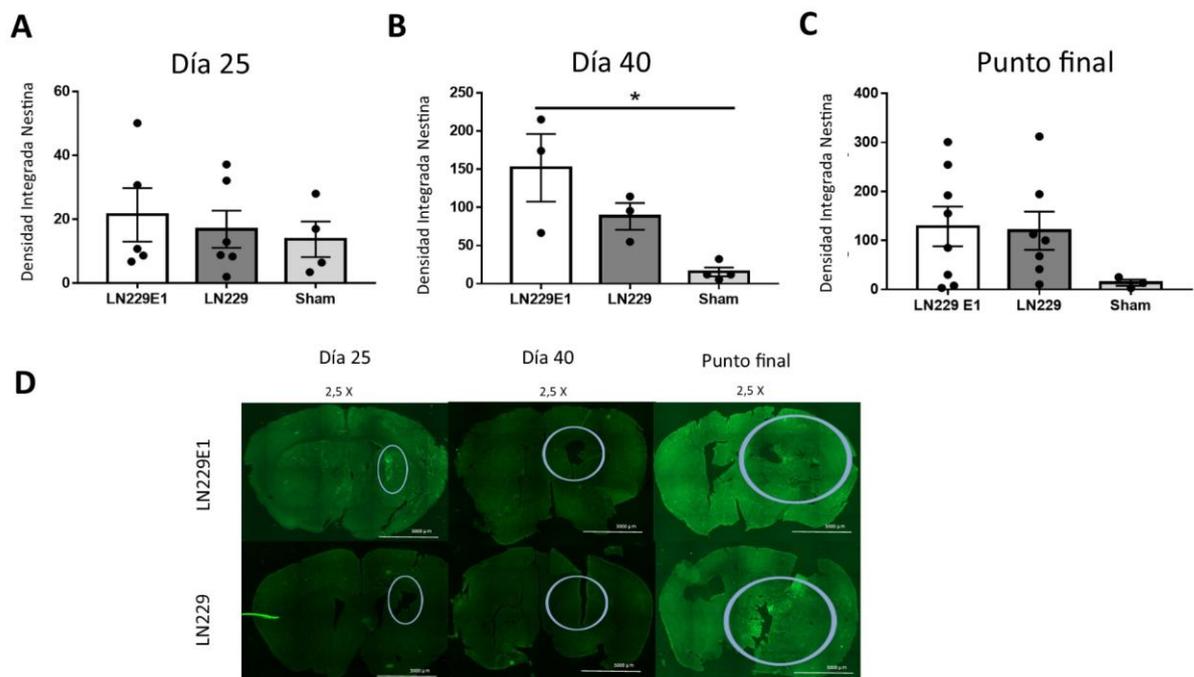


Figura 5.7. La expresión de nestina no muestra diferencias significativas entre ambos genotipos tumorales. Expresión de nestina (mostrada como densidad integrada) de ratones implantados con células LN229, LN229E1 o *sham*, en el día 25 (A) (n=5, prueba ANOVA de una vía, ns), el día 40 (B) (n=3, prueba ANOVA de una vía, $p < 0,05$, prueba de comparaciones múltiples de Dunns: LN229E1 vs Sham, $*p < 0,05$) y en el punto final (C) (n=7, prueba ANOVA de una vía, ns). (D) Micrografías representativas (2,5 y 10 X) de la expresión de nestina obtenidas para el día 25, el día 40, y el punto final. El área del tumor está resaltada con un círculo azul.

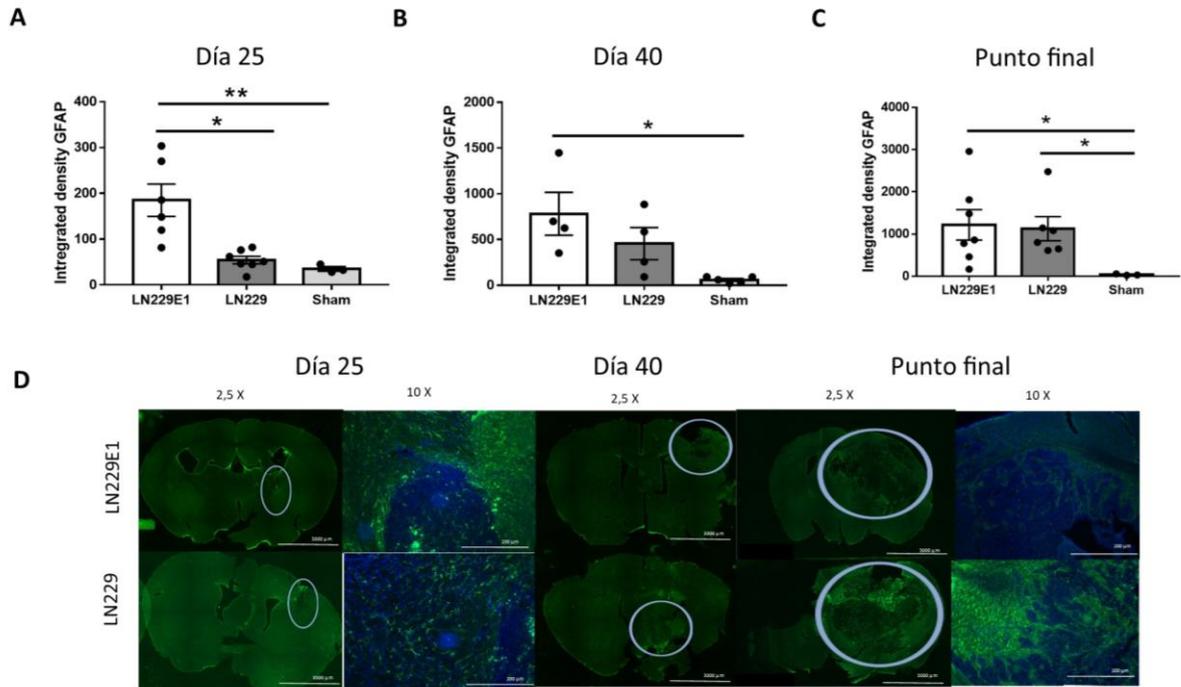


Figura 5.8. La expresión de GFAP en astrocitos del microambiente del GBM aumenta el día 25 después de la implantación con células tumorales *knock down* para *bmal1*. Expresión de GFAP (mostrada como densidad integrada) de ratones implantados con células LN229, LN229E1 o *sham*, en el día 25 (A) (n=6, prueba ANOVA de una vía, $p < 0,01$, prueba de comparaciones múltiples de Dunns: LN229E1 frente a LN229, $*p < 0,05$, LN229E1 frente a *sham*, $**p < 0,01$), en el día 40 (B) (n=4, ANOVA de una vía, $p < 0,01$, prueba de comparaciones múltiples de Dunns: LN229E1 frente a *sham*, $*p < 0,05$), en el punto final (C) (n=6, prueba ANOVA de una vía, $p < 0,05$, prueba de comparaciones múltiples de Dunns: LN229E1 frente a *sham*, $*p < 0,05$, LN229 frente a Sham, $*p < 0,05$). (D) Micrografías representativas (2,5 y 10 X) de la expresión de GFAP para el día 25, el día 40, y el punto final. El área del tumor está resaltada con un círculo azul.

Si bien no se encontraron diferencias en la expresión de nestina a lo largo de la progresión tumoral para ambos genotipos (Figura 5.7), GFAP exhibió una mayor expresión en los astrocitos peri-tumorales de las células LN229E1 en el día 25 posterior a la implantación (Figura 5.8 A). Esta diferencia se pierde en el día 40 y en

el punto final (Figura 5.8 B y C), como se observó con CD44. De la misma manera que se observa con CD44, la expresión de GFAP en los astrocitos que rodean a los tumores aumenta a medida que el tumor crece y progresa. Además, es posible determinar la expresión de este marcador específicamente en los astrocitos peritumorales, así como observar los que están infiltrando el tumor, como se muestra en las micrografías representativas de la Figura 5.8 D (tumor más astrocitos reactivos resaltados con un círculo azul), lo cual permite concluir que la expresión de GFAP ocurre en astrocitos reactivos del microambiente, pero no en la masa tumoral del GBM.

Conjuntamente, estos resultados demuestran que la falta del gen reloj *bmal1* produce, en etapas tempranas del tumor, una sobre-expresión de CD44 en GBM, y una mayor expresión de GFAP en los astrocitos del microambiente, lo cual evidencia una mayor reactividad de los astrocitos peritumorales cuando las células de GBM carecen de una regulación circadiana.

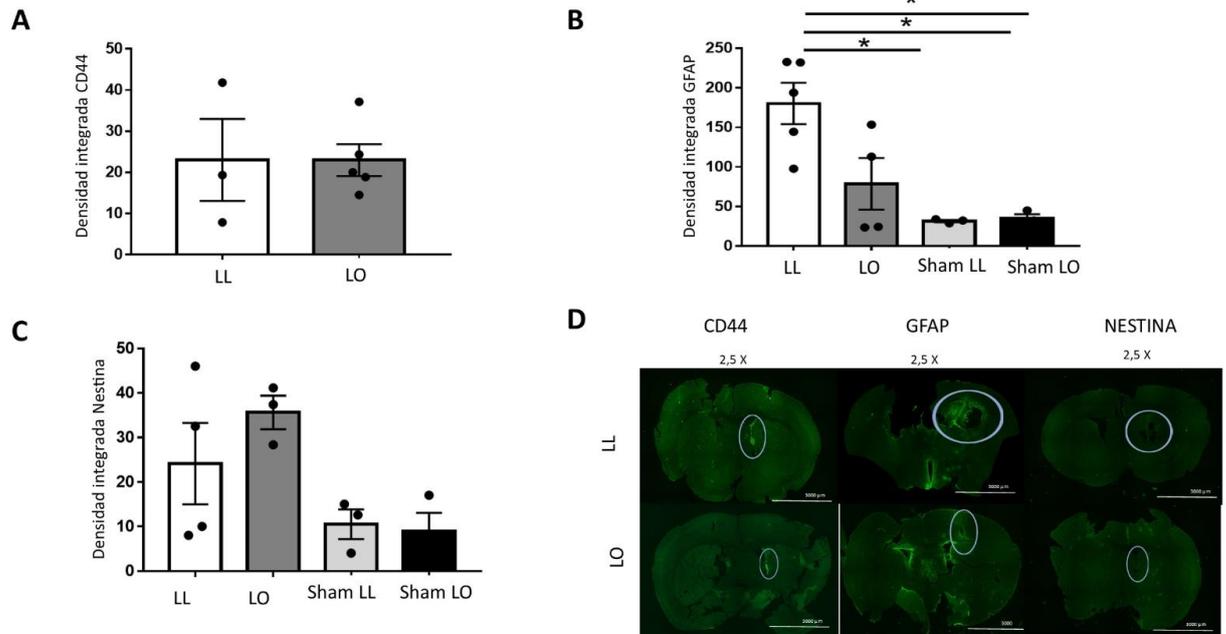
4.5. Evaluación de la expresión de CD44 en GBM y la reactividad de astrocitos en ratones *nude* expuestos a condiciones de luz constante.

Al igual que en el protocolo anterior, se evaluaron las expresiones de CD44, GFAP y nestina, en ratones *nude* expuestos a condiciones de luz constante (LL) o condiciones control bajo ciclos LO 12:12. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de CD44 y de nestina, tanto para el día 25 como para el punto final en ambos esquemas de luz (Figura 5.9 A y C). No obstante, la expresión de GFAP de los astrocitos que rodean el tumor en ratones expuestos a LL fue mayor el día 25 (Figura 5.9 B) con respecto a LO. Esta diferencia se perdió

en el punto final (Figura 5.9, E y F). Cabe destacar que los ratones *sham* muestran poca expresión de GFAP y nestina, sin diferencias significativas entre las condiciones LL y LO. Las figuras 5.9 D y G muestran imágenes representativas de las marcas con GFAP, CD44 y nestina, tanto para ratones bajo LL, como para aquellos bajo LO.

Estos resultados indican que la condición de LL está afectando la expresión de GFAP de los astrocitos peri-tumorales en etapas tempranas, pero no la expresión del marcador de prognosis CD44.

Día 25



Punto final

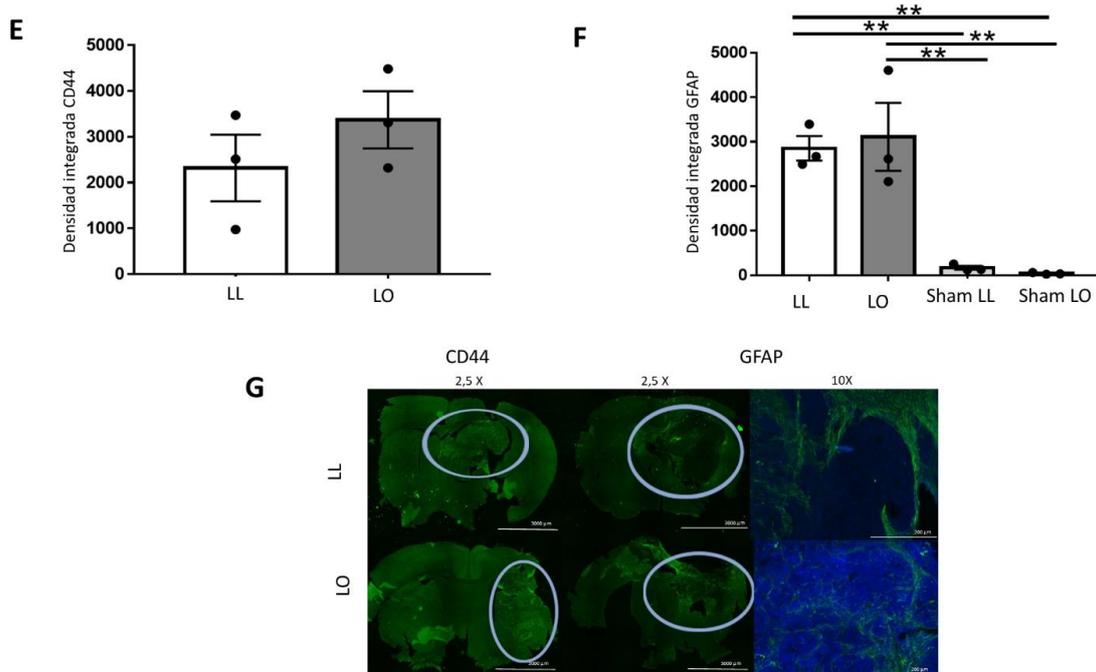


Figura 5.9. La expresión de GFAP en los astrocitos del microambiente del GBM aumenta el día 25 después de la implantación en ratones sometidos a LL. Expresión de CD44, GFAP y nestina (mostrada como densidad integrada) de ratones bajo ciclos LL o LO el día 25 (A-D) o punto final (E-

G). (A) Expresión de CD44 el día 25 (n=3, prueba T no pareada, ns), (B) Expresión de GFAP el día 25 (n=4, ANOVA de una vía, $p < 0,01$. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey: LL vs LO: $*p < 0,05$; LL vs *sham* LL: $**p < 0,01$; LL vs *sham* LD: $**p < 0,01$). (C) Expresión de nestina el día 25 (n = 4, ANOVA de una vía, ns). (D) Micrografías representativas (2,5 X) de la expresión de CD44, GFAP y nestina en ratones expuestos a ciclos de luz LL o LO el día 25. El área del tumor se resalta con un círculo azul. (E) Expresión de CD44 en el punto final (n = 3, prueba T no pareada, ns). (F) Expresión de GFAP en el punto final (n=3, ANOVA unidireccional, $p < 0,01$. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey: LL vs LO: ns; LL vs *sham* LL: $**p < 0,01$; LL vs *sham* LO: $**p < 0,01$; LO frente a *sham* LL: $**p < 0,01$; LO frente a Sham LO: $**p < 0,01$). (G) Micrografías representativas (2,5 X y 10 X) de la expresión de CD44 y GFAP en ratones expuestos a ciclos de luz LL o LO para el punto final. El área del tumor está resaltada con un círculo azul.

5. Discusión

El microambiente tumoral es crucial en la progresión del GBM (Matias *et al.*, 2018) y ya se ha demostrado que el reloj circadiano juega un papel en su remodelación. Existe evidencia reciente que indica que CLOCK se encarga de reclutar microglía inmunosupresora en células madre de glioma, y que la inhibición de CLOCK reduce este tipo de microglía y prolonga la supervivencia general en ratones (Xuan *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2020). Además, recientemente se demostró que el gen *bmal1* promueve la angiogénesis a través de VEGF (Wang *et al.*, 2021). Sin embargo, mientras que el papel del reloj circadiano en el control de la microglía se empieza a describir en profundidad, la reactividad de los astrocitos y su dependencia del reloj circadiano aún no ha sido estudiada en GBM. Por tanto, utilizando las células LN229E1 deficientes del gen reloj *bmal1*, en el presente capítulo se llevó a cabo un estudio del control circadiano del microambiente tumoral, centrado en la reactividad astrocitaria tanto *in vitro*, mediante co-cultivos indirectos, como *in vivo*, a través de un modelo ortotópico de glioma en ratones *nude* macho.

Los co-cultivos indirectos permiten evidenciar comunicaciones del tipo paracrina entre las células (ver la “Introducción” del Capítulo II). Por lo tanto, para analizar la influencia de los factores solubles que las células producen sobre otros tipos celulares, se llevaron a cabo experimentos con medios condicionados. En primera instancia, se adicionó medio condicionado tanto de células LN229 como LN229E1 de GBM a astrocitos, en distintos HPS. Se evidenció que los astrocitos poseen una mayor proliferación frente al agregado de medios condicionados de células de GBM, como ya había sido descrito en otros trabajos (Oushy *et al.*, 2018).

Sin embargo, no se evidenciaron diferencias entre el agregado de medios condicionados de LN229 o LN229E1 (Figura 5.2), demostrándose que el reloj molecular de la célula de GBM no estaría regulando la comunicación paracrina en la proliferación de los astrocitos, cuando la misma se evalúa mediante co-cultivos indirectos. Sin embargo, cabe destacar que la reactividad de los astrocitos es una mejor medida de la respuesta de estos frente a las células de GBM que la proliferación. Es por esto que, si bien los resultados de proliferación no son significativos frente al agregado de medios condicionados de ambos genotipos celulares de GBM, esto no necesariamente se condice con los marcadores de reactividad astrocitaria. Dichos marcadores fueron evaluados posteriormente en un modelo *in vivo*.

Posteriormente, se procedió a evaluar la respuesta de las células de GBM frente al agregado de medios condicionados de astrocitos en distintos horarios. Ya ha sido demostrado que las células de GBM aumentan su proliferación y migración cuando son activadas con medios condicionados de astrocitos (Rath *et al.*, 2013; Okolie *et al.*, 2016). Por lo tanto, nos preguntamos si esta activación es diferencial dependiendo del momento del día, y si se encuentra modulada por el reloj molecular de la célula de GBM. Observamos que la proliferación de las células LN229 aumenta en respuesta al agregado de medios condicionados de astrocitos (Figura 5.3 B), como ya ha sido descrito (Rath *et al.*, 2013; Okolie *et al.*, 2016). Sin embargo, las células LN229E1, deficientes de *bmal1*, no aumentan su proliferación cuando se les adiciona el medio condicionado (Figura 5.3 C). Como ya fue demostrado en el Capítulo I, la ausencia de *bmal1* genera una menor proliferación *in vitro*, evidenciando un impacto sobre el ciclo celular, lo cual ya se ha demostrado en diversos tipos celulares (Sarkar *et al.*, 2021; Ueda *et al.*, 2022; Astone *et al.*, 2023).

Particularmente, Wagner *et al.* han observado un arresto de células T98G deficientes de *bmal1* en la fase G0/G1 (datos no publicados). Si bien en el presente trabajo no evaluamos el ciclo celular de las células LN229E1, es posible hipotetizar que su ciclo celular se encuentre alterado. Por lo tanto, es posible que los factores liberados por los astrocitos estén impactando en distintas fases del ciclo celular en las células LN229 y en las LN229E1, lo cual daría cuenta de los distintos fenotipos observados frente al agregado del medio condicionado. Sin embargo, es necesario continuar realizando experimentos en ese sentido, como evaluar el ciclo celular de las células LN229E1 y los factores solubles presentes en el medio condicionado de los astrocitos, para poder sacar más conclusiones al respecto.

Finalmente, al adicionar medio condicionado de astrocitos a las células LN229 en distintos HPS, se observa un ritmo de respuesta en la proliferación de estas, con un máximo en 12 HPS (Figura 5.3 A), lo cual no había sido demostrado hasta el momento en células de GBM, pero sí en otros tipos celulares, como en adenocarcinoma intestinal expuesto a medio condicionado de fibroblastos (Parascandolo *et al.*, 2020). Sin medio condicionado, las células no poseen ritmos en su proliferación, pero estos aparecen frente a la activación con medios condicionados de astrocitos. Ya ha sido descrito ampliamente que los astrocitos poseen un reloj circadiano (Marpegan *et al.*, 2011; Hastings *et al.*, 2023) regulando la expresión de muchas de las proteínas y metabolitos que los mismos producen (Tso *et al.*, 2017; Gerstner *et al.*, 2023; Ishii *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta lo ya descrito por otros trabajos, es posible que los astrocitos se encuentren produciendo factores pro-tumorales en distintos HPS, los cuales podrían actuar diferencialmente en la proliferación de las células de GBM. Es necesario continuar analizando los compuestos solubles en el medio condicionado de los astrocitos para determinar si

efectivamente hay una liberación diferencial de factores pro-tumorales, dependiendo del horario circadiano.

Una vez que se evidenció que las células LN229 poseen una respuesta circadiana en su proliferación frente a la activación con medios condicionados de astrocitos, respuesta que se encuentra ausente en las células LN229E1, se procedió a analizar la expresión del marcador de prognosis CD44 en ambos tipos celulares, frente al agregado de medios condicionados de astrocitos en dos horarios circadianos, 4 y 16 HPS. Al comparar con los controles, se vio que las células LN229E1 no presentan diferencias en su expresión de CD44 frente al agregado de los medios condicionados, en ninguno de los dos horarios evaluados. Por el contrario, las células LN229 expresan mayor cantidad de CD44 frente al agregado del medio condicionado, particularmente en 16 HPS (Figura 5.4). Ya fue demostrado recientemente por Du *et al.* (2022) en células de GBM U87 que el agregado de medios condicionados de astrocitos promueve la expresión de CD44, generando una mayor migración celular y una peor prognosis. En el presente Capítulo, además de obtener los mismos resultados en otra línea celular de GBM, se pone en evidencia que dicha activación es dependiente del horario evaluado. Se ha hipotetizado en diversos trabajos que CD44 es controlado por el reloj circadiano en diversos tipos de cáncer (El-Athman *et al.*, 2018; Xiang *et al.*, 2018). Por lo tanto, las diferencias observadas en cuanto a la respuesta de los genotipos celulares frente a la adición de medios condicionados en la expresión de CD44 podrían explicarse por la ausencia de un reloj circadiano estable en las células LN229E1.

Luego de realizados los análisis *in vitro* y teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se procedió con el estudio del comportamiento de ambos tipos celulares

con respecto a su prognosis e interacción con el microambiente en el modelo ortotópico de GBM *in vivo*. El estudio se centró, en analizar la reactividad de los astrocitos peri-tumorales frente a factores liberados por las células LN229 y LN229E1, para evidenciar si la deficiencia de *bmal1* genera una diferencia en la interacción con los astrocitos del microambiente. Por otro lado, se evaluó la expresión del marcador de prognosis CD44 en el desarrollo de GBMs de ambos genotipos celulares.

Los astrocitos reactivos se han descrito en una variedad de situaciones patológicas, incluido el GBM (Matias *et al.*, 2018). Hay diversas formas de determinar la reactividad de los astrocitos, siendo GFAP el marcador de consenso, el cual ya ha sido utilizado para determinar la activación de los astrocitos en áreas peri-tumorales (O' Brien *et al.*, 2013). No obstante, en los últimos años se ha recomendado el uso de al menos dos marcadores para determinar la reactividad de los astrocitos (Escartin *et al.*, 2021). Por lo tanto, nuestro objetivo fue describir la reactividad de los astrocitos en ratones implantados con células LN229 y LN229E1 utilizando dos marcadores, nestina y GFAP. Mientras que no se observaron diferencias en la expresión de nestina (Figura 5.7), GFAP se encontró sobreexpresada en el microambiente tumoral de LN229E1 en el día 25 post implantación (no así en el día 40 y en el punto final) (Figura 5.8) con respecto al microambiente de LN229. Estos resultados indican que la desregulación de *bmal1* en las células LN229E1 estaría aumentando la activación de los astrocitos alrededor del tumor en estadíos tempranos, colaborando con el fenotipo más agresivo y el mayor crecimiento tumoral evidenciado en GBMs de células LN229E1 (ver Capítulo I). Cabe destacar que la oscilación circadiana de GFAP en los astrocitos de los NSQ ya ha sido descrita (Leone *et al.*, 2006), por lo que los resultados obtenidos en la

presente tesis podrían ir de la mano con la idea del control circadiano que opera sobre GFAP.

A su vez, se evaluó la expresión del marcador de prognosis CD44, un marcador bien establecido asociado con un mal pronóstico de GBM (Dzobo *et al.*, 2020; Hou *et al.*, 2019). Similar a lo obtenido para GFAP, se observa que CD44 se sobreexpresa en las células LN229E1 el día 25 después de la implantación, pero estas diferencias con respecto a LN229 se pierden en el día 40 y en el punto final (Figura 5.6), es decir, cuando el tumor consolida su ritmo de crecimiento, según se evidenció en el Capítulo I. Estos resultados son consistentes con la idea de que CD44 es un marcador de células iniciadoras de tumores (Mooney *et al.*, 2016), por lo cual se sobreexpresa en estadios tempranos.

Ya se ha demostrado que existe una interacción entre la expresión de GFAP de los astrocitos y la expresión de CD44 de GBM en células U87 (Du *et al.*, 2022), lo que demuestra la importancia de los astrocitos reactivos en la determinación de la expresión de CD44 en el GBM. Teniendo en cuenta que en este trabajo se encontró una expresión aumentada de CD44 y de GFAP en el día 25 post implante en los tumores de LN229E1, es posible que se esté produciendo una relación similar a la encontrada en las células U87, entre los astrocitos reactivos y el pronóstico de GBM. Por lo tanto, es fundamental tener en cuenta el rol de *bmal1* como remodelador del microambiente astrocítico del GBM y la interacción de este con la expresión de marcadores de prognosis, como por ejemplo CD44. Por otro lado, es posible que el mayor crecimiento evidenciado se deba al rol que *bmal1* posee en el ciclo celular (como ya fue debatido en el Capítulo I), y que tanto el aumento en la expresión de CD44 como la mayor reactividad astrocítica mediada por GFAP, sean

una salida relacionada a mecanismos alternativos, los cuales pueden ser tomados como marcadores de pronosis y mayor proliferación.

En el presente Capítulo, se buscó también analizar la reactividad de los astrocitos peri-tumorales y la expresión de CD44 de las células LN229E1, frente a la exposición a luz constante. A la fecha, no se han llevado a cabo estudios sobre cómo la luz constante afecta al microambiente tumoral y la expresión de marcadores de pronosis en GBM. Solo un estudio ha analizado, en un modelo de glioma subcutáneo heterotópico en ratas, cómo este tipo de esquemas afecta a la interacción del GBM con su entorno, observando un incremento en el metabolismo anabólico del hospedador (Guerrero-Vargas *et al.*, 2017).

En la presente tesis se observó que la disrupción circadiana central por exposición crónica a LL no modifica la expresión del marcador de pronosis CD44, pero afecta la expresión de GFAP (no así la de nestina) en los astrocitos (Figura 5.9). Estos resultados sugieren que la reactividad de los astrocitos en el GBM podría tomarse como un factor de riesgo en situaciones de alteración circadiana del hospedador, pero que es necesario analizar situaciones de arritmicidad central del hospedador, para evidenciar si de esta manera se ve afectado el pronóstico del tumor.

Por lo tanto, a modo de conclusión del presente capítulo puede decirse que la inhibición de *bmal1* en las células LN229 de GBM modula la interacción con su microambiente, particularmente generando un aumento de la expresión de GFAP en los astrocitos reactivos peri-tumorales y aumentando la expresión del marcador de pronosis CD44 en estadios tempranos. A su vez, la alteración del reloj central del ratón hospedador mediante exposición a LL genera un aumento en la expresión

de GFAP en los astrocitos peri-tumorales en estadios tempranos, pero no afecta la expresión de CD44 en el tumor. Por lo tanto, la disrupción del reloj circadiano en las células tumorales de GBM estaría teniendo un impacto en la remodelación del microambiente tumoral y en la prognosis, mientras que las alteraciones circadianas ambientales del reloj circadiano central (LL con alargamiento de período) del ratón *nude* hospedador solo afectaría el microambiente a nivel de los astrocitos, pero no la prognosis del tumor.

6. Resumen del Capítulo

En el presente capítulo se obtuvieron los siguientes resultados:

- Existe un ritmo circadiano en la respuesta proliferativa de las células LN229 frente a la adición de medios condicionados de astrocitos, el cual se pierde en células LN229E1, deficientes en la expresión de *bmal1*.
- Las células LN229E1 no varían su proliferación frente a la activación mediante medios condicionados de astrocitos.
- Al implantar células LN229E1 en ratones nude, se observa mayor expresión de CD44 en el GBM en el día 25 post implantación, pero no en el día 40, ni en el punto final.
- Al implantar células LN229E1 en ratones nude, se observa mayor expresión de GFAP en los astrocitos del microambiente en el día 25 post implantación, pero no en el día 40, ni en el punto final.
- Al exponer a ratones nude a esquemas de luz constante, se observa mayor expresión de GFAP en los astrocitos del microambiente en el día 25 post implantación, pero no en el punto final.

Bibliografía del Capítulo II

Aiello I, *et al.* (2020). 'Circadian disruption promotes tumor-immune microenvironment remodeling favoring tumor cell proliferation'. *Sci Adv.* 6(42):eaaz4530. doi: 10.1126/sciadv.aaz4530.

Astone M, Oberkersch RE, Tosi G, Biscontin A, Santoro MM (2023) 'The circadian protein BMAL1 supports endothelial cell cycle during angiogenesis'. *Cardiovasc Res.* cvad057. doi: 10.1093/cvr/cvad057.

Barbero S, B *et al.* (2002) 'Expression of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1 in human brain tumors and their involvement in glial proliferation in vitro'. *Ann N Y Acad Sci* 973(1):60–69. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04607.x>

Burda JE and Sofroniew MV (2014) 'Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease'. *Neuron* 81 (2), 229–48. [PubMed: 24462092]

Bush TG *et al.* (1999) 'Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice'. *Neuron* 23 (2), 297–308.

Chekhonin IV, Chistiakov DA, Grinenko NF, Gurina OI. (2018) 'Glioma Cell and Astrocyte Co-cultures As a Model to Study Tumor-Tissue Interactions: A Review of Methods'. *Cell Mol Neurobiol.* 38(6):1179-1195. doi: 10.1007/s10571-018-0588-3.

Chen P, *et al.* (2020). 'Circadian Regulator CLOCK Recruits Immune-Suppressive Microglia into the GBM Tumor Microenvironment'. *Cancer Discov.* 10(3):371-381. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0400.

Chen, W., *et al.* (2016). 'Human astrocytes secrete IL-6 to promote glioma migration and invasion through upregulation of cytomembrane MMP14'. *Oncotarget.* 7 62425–62438. doi: 10.18632/oncotarget.11515

Du Z, *et al.* (2022) 'Association of glioma CD44 expression with glial dynamics in the tumour microenvironment and patient prognosis'. *Comput Struct Biotechnol J.* 20:5203-5217. doi: 10.1016/j.csbj.2022.09.003.

Dzobo K, (2020) 'Advances in Therapeutic Targeting of Cancer Stem Cells within the Tumor Microenvironment: An Updated Review'. *Cells.* 9(8):1896. doi: 10.3390/cells9081896.

Dzwonek J, Wilczynski GM. (2015) 'CD44: molecular interactions, signaling and functions in the nervous system'. *Front Cell Neurosci.* 9:175. doi: 10.3389/fncel.2015.00175.

El-Athman R, Fuhr L, Relógio A. (2018). 'A Systems-Level Analysis Reveals Circadian Regulation of Splicing in Colorectal Cancer'. *EBioMedicine.* 33:68-81. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.06.012.

Escartin C, *et al.* (2021) 'Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions'. *Nat Neurosci.* 24(3):312-325. doi: 10.1038/s41593-020-00783-4.

Gagliano N, *et al* (2009) 'Glioma-astrocyte interaction modifies the astrocyte phenotype in a co-culture experimental model'. *Oncol Rep* 22(6):1349–1356

Garcia C, *et al.* (2014). 'The orthotopic xenotransplant of human glioblastoma successfully recapitulates glioblastoma-microenvironment interactions in a non-immunosuppressed mouse model'. *BMC Cancer*. 2014 Dec 8;14:923. doi: 10.1186/1471-2407-14-923.

Gerstner JR, Flores CC, Lefton M, Rogers B, Davis CJ. (2023) 'FABP7: a glial integrator of sleep, circadian rhythms, plasticity, and metabolic function'. *Front Syst Neurosci*;17:1212213. doi: 10.3389/fnsys.2023.1212213.

Gieryng A, *et al.* (2017). 'Immune microenvironment of gliomas'. *Lab Invest*. 97(5):498-518. doi: 10.1038/labinvest.2017.19.

Guan, X., Hasan, M. N., Maniar, S., Jia, W., and Sun, D. (2018). 'Reactive astrocytes in glioblastoma multiforme'. *Mol. Neurobiol*. doi: 10.1007/s12035-018-0880-8.

Guerrero-Vargas NN, *et al.* (2017). 'Circadian disruption promotes tumor growth by anabolic host metabolism; experimental evidence in a rat model'. *BMC Cancer*. 17(1):625. doi: 10.1186/s12885-017-3636-3.

Hastings MH, Brancaccio M, Gonzalez-Aponte MF, Herzog ED (2023) 'Circadian Rhythms and Astrocytes: The Good, the Bad, and the Ugly'. *Annu Rev Neurosci* doi: 10.1146/annurev-neuro-100322-112249.

Henrik Heiland D *et al.* (2019). 'Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma'. *Nat Commun*. 10(1):2541. doi: 10.1038/s41467-019-10493-6.

Hou C, *et al.* (2019). 'Overexpression of CD44 is associated with a poor prognosis in grade II/III gliomas'. *J Neurooncol*. 145(2):201-210. doi: 10.1007/s11060-019-03288-8.

Irvin, D. M., McNeill, R. S., Bash, R. E., Miller, C. R. (2017). 'Intrinsic astrocyte heterogeneity influences tumor growth in glioma mouse models'. *Brain Pathol.* 27, 36–50. doi: 10.1111/bpa.12348

Ishii T, Warabi E, Mann GE (2019) 'Circadian control of BDNF-mediated Nrf2 activation in astrocytes protects dopaminergic neurons from ferroptosis'. *Free Radic Biol Med.* 133:169-178. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.002.

Jin P, *et al.* (2018) 'Astrocyte-derived CCL20 reinforces HIF-1-mediated hypoxic responses in glioblastoma by stimulating the CCR6-NF- κ B signaling pathway'. *Oncogene.* 37(23):3070-3087. doi: 10.1038/s41388-018-0182-7.

Kreße N, *et al.* (2022) 'PLOD2 Is a Prognostic Marker in Glioblastoma That Modulates the Immune Microenvironment and Tumor Progression'. *Int J Mol Sci.* 23(11):6037. doi: 10.3390/ijms23116037.

Leone MJ, Marpegan L, Bekinschtein TA, Costas MA, Golombek DA (2006). 'Suprachiasmatic astrocytes as an interface for immune-circadian signalling'. *J Neurosci Res.* 84(7):1521-7. doi: 10.1002/jnr.21042. PMID: 16955486.

Marpegan L, *et al* (2011) 'Circadian regulation of ATP release in astrocytes'. *J. Neurosci.* 31:8342–50,

Matias D, *et al.* (2018). 'Microglia/Astrocytes-Glioblastoma Crosstalk: Crucial Molecular Mechanisms and Microenvironmental Factors'. *Front Cell Neurosci.* 12:235. doi: 10.3389/fncel.2018.00235.

McCarthy KD, de VJ. (1980) 'Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue'. *J. Cell Biol.* 85:890–902.

Mooney KL, *et al.* (2016). 'The role of CD44 in glioblastoma multiforme'. *J Clin Neurosci.* 34:1-5. doi: 10.1016/j.jocn.2016.05.012.

O'Brien ER, Howarth C, Sibson NR (2013). 'The role of astrocytes in CNS tumors: pre-clinical models and novel imaging approaches'. *Front Cell Neurosci.* 7:40. doi: 10.3389/fncel.2013.00040.

Okolie O, *et al.* (2016) 'Reactive astrocytes potentiate tumor aggressiveness in a murine glioma resection and recurrence model'. *Neuro Oncol.* 18(12):1622-1633. doi: 10.1093/neuonc/now117.

Olah M, *et al.* (2012) 'An optimized protocol for the acute isolation of human microglia from autopsy brain samples'. *Glia.* 60(1):96-111. doi: 10.1002/glia.21251.

Oushy S, *et al.* (2018) 'Glioblastoma multiforme-derived extracellular vesicles drive normal astrocytes towards a tumour-enhancing phenotype'. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 373(1737):20160477. doi: 10.1098/rstb.2016.0477.

Pang L, *et al.* (2023). 'Circadian regulator CLOCK promotes tumor angiogenesis in glioblastoma'. *Cell Rep.* 42(2):112127. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112127.

Parascandolo A, *et al.* (2020) 'Effect of naive and cancer-educated fibroblasts on colon cancer cell circadian growth rhythm'. *Cell Death Dis.* 2020. 11(4):289. doi: 10.1038/s41419-020-2468-2.

Priego N, *et al.* (2018) 'STAT3 labels a subpopulation of reactive astrocytes required for brain metastasis'. *Nat Med.* 24(7):1024-1035. doi: 10.1038/s41591-018-0044-4.

Rath BH, Fair JM, Jamal M, Camphausen K, Tofilon PJ (2013). 'Astrocytes enhance the invasion potential of glioblastoma stem-like cells'. *PLoS One*. 8(1):e54752. doi: 10.1371/journal.pone.0054752.

Roessler K, *et al.* (1995) 'Detection of tumor necrosis factor-alpha protein and messenger RNA in human glial brain tumors: comparison of immunohistochemistry with in situ hybridization using molecular probes'. *J Neurosurg*. 83(2):291-7. doi: 10.3171/jns.1995.83.2.0291.

Roggendorf W, Strupp S, Paulus W (1996). 'Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors'. *Acta Neuropathol*. 92(3):288-93. doi: 10.1007/s004010050520

Sarkar S, *et al.* (2021) 'Circadian clock protein BMAL1 regulates melanogenesis through MITF in melanoma cells'. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2021 Sep;34(5):955-965. doi: 10.1111/pcmr.12998. Epub 2021 Jul 6. PMID: 34160901; PMCID: PMC8429232.

Sharma P, Aaroe A, Liang J, Pudevalli VK. (2023) 'Tumor microenvironment in glioblastoma: Current and emerging concepts'. *Neurooncol Adv*. 5(1):vdad009. doi: 10.1093/noajnl/vdad009.

Shelke GV, Lässer C, Gho YS, Lötvall J (2014). 'Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum'. *J Extracell Vesicles*. 3. doi: 10.3402/jev.v3.24783.

Sofroniew MV (2020) 'Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity'. *Trends Immunol*. 41(9):758-770. doi: 10.1016/j.it.2020.07.004.

Sofroniew MV and Vinters HV (2010). 'Astrocytes: biology and pathology'. *Acta Neuropathol* 119 (1), 7–35.

Theodoric N, Bechberger JF, Naus CC, Sin WC (2012) 'Role of gap junction protein connexin43 in astrogliosis induced by brain injury'. *PLoS One* 7(10):e47311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047311>

Tso CF, Simon T, Greenlaw AC, Puri T, Mieda M, Herzog ED (2017) 'Astrocytes Regulate Daily Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus and Behavior'. *Curr Biol.* 27(7):1055-1061. doi: 10.1016/j.cub.2017.02.037.

Ueda M, *et al.* (2022). 'Bmal1 Regulates Prostate Growth via Cell-Cycle Modulation'. *Int J Mol Sci.* 23(19):11272. doi: 10.3390/ijms231911272.

van der Vos, K. E *et al.* (2016). 'Directly visualized glioblastoma-derived extracellular vesicles transfer RNA to microglia/macrophages in the brain'. *Neuro Oncol.* 18, 58–69. doi: 10.1093/neuonc/nov244

Vis MAM, Ito K, Hofmann S. (2020) 'Impact of Culture Medium on Cellular Interactions in *in vitro* Co-culture' *Systems. Front Bioeng Biotechnol.* 8:911. doi: 10.3389/fbioe.2020.00911. Volume 3, December 2021, 100017

Wang F, Li C, Han F, Chen L, Zhu L (2021). 'BMAL1 may be involved in angiogenesis and peritumoral cerebral edema of human glioma by regulating VEGF and ANG2'. *Aging (Albany NY).* 13(22):24675-24685. doi: 10.18632/aging.203708.

Xiang R, *et al.* (2018). Circadian clock gene Per2 downregulation in non-small cell lung cancer is associated with tumor progression and metastasis. *Oncol Rep.* 40(5):3040-3048. doi: 10.3892/or.2018.6704.

Xuan W, *et al.* (2022) 'Circadian Regulator CLOCK Drives Immunosuppression in Glioblastoma'. *Cancer Immunol Res.* 10(6):770-784. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-21-0559.

Yang Y, *et al.* (2019). 'Circadian clock associates with tumor microenvironment in thoracic cancers'. *Aging (Albany NY)*. 11(24):11814-11828. doi: 10.18632/aging.102450.

Yang, J.-K., *et al.* (2017). 'Exosomal miR-221 targets DNMT3 to induce tumor progression and temozolomide resistance in glioma'. *J. Neurooncol.* 131, 255–265. doi: 10.1007/s11060-016-2308-5.

Žavbi, J, Breznik, B. (2021) 'Modelling the microenvironment of the most aggressive brain tumours for preclinical studies'. *Advances in Cancer Biology - Metastasis*.

Zeng A, (2020) 'Glioblastoma-Derived Extracellular Vesicles Facilitate Transformation of Astrocytes via Reprogramming Oncogenic Metabolism'. *iScience*. 23(8):101420. doi: 10.1016/j.isci.2020.101420.

Zeng N *et al.* (2022) Construction of Circadian Clock Signature for Tumor Microenvironment in Predicting Survival for Cutaneous Melanoma. *Curr Pharm Des.* 28(28):2349-2361. doi: 10.2174/1381612828666220802114517.

Zhang L, Zhang Y (2015) 'Tunneling nanotubes between rat primary astrocytes and C6 glioma cells alter proliferation potential of glioma cells'. *Neurosci Bull* 31(3):371–378. <https://doi.org/10.1007/s12264-014-1522-4> 35.

Zhang ZM, Yang Z, Zhang Z. (2015) 'Distribution and characterization of tumor-associated macrophages/microglia in rat C6 glioma'. *Oncol Lett.* 10(4):2442-2446. doi: 10.3892/ol.2015.3533.

Zhang, W., *et al.* (1999). 'Direct gap junction communication between malignant glioma cells and astrocytes'. *Cancer Res.* 59, 1994–2003.

Capítulo III.

Estudio

**cronofarmacológico de
Temozolomida y la droga
novedosa 1A-116 para el
tratamiento del
glioblastoma**

1. Introducción

1.1. Cronofarmacología

El sistema circadiano determina ritmos en la mayoría de los procesos fisiológicos, como ya fue explicado en la “Introducción general”. Pocos años después del inicio de los estudios en cronobiología, comenzó a estudiarse la variabilidad a lo largo del día en la acción de las drogas y tratamientos, descubriéndose que diversas drogas presentan ritmos circadianos en su perfil farmacocinético, así como en su efectividad y toxicidad. Es así como surgió la cronofarmacología, un campo clínico y experimental de la cronobiología que año a año cobra cada vez más importancia.

Los ritmos circadianos en la ingesta calórica, el gasto energético, ritmos en procesos digestivos, endocrinos, en el control del flujo sanguíneo hacia un tejido, hasta ritmos en los niveles y actividad de proteínas que actúan como transportadores o enzimas, determinan ritmos en la absorción, distribución, metabolización y en la eliminación de drogas, es decir, en la farmacocinética de una droga, lo cual es conocido como cronofarmacocinética. A su vez, las oscilaciones de los blancos, receptores, y componentes de los sistemas de señalización de los agonistas endógenos de estas drogas, determinan ritmos en el efecto de drogas, lo cual se conoce como cronofarmacodinamia (Tahara *et al*, 2014, Dallmann *et al*, 2014). Por lo tanto, la detección de estas oscilaciones permite modificar la toxicidad y la eficacia de una diversidad de fármacos, controlando su momento diario de administración. Este es, justamente, el objetivo principal de la cronofarmacología:

determinar la hora del día en la cual el efecto terapéutico de un determinado fármaco es máximo y, a su vez, minimizar sus efectos secundarios. En este sentido, dos conceptos son importantes a la hora de analizar el valor terapéutico de una droga con un enfoque cronofarmacológico: su efectividad, su toxicidad, y las potenciales variaciones circadianas de estos parámetros. Adoptando ambos conceptos se determina el índice terapéutico de los fármacos y su dependencia de la fase circadiana (Dallman *et al.*, 2014; Trebucq *et al.*, 2020).

Diversas drogas se han estudiado y administrado con enfoques cronofarmacológicos a lo largo de los años. Por ejemplo, la farmacodinamia de drogas cardiovasculares ha sido ampliamente estudiada, y hay una gran cantidad de evidencias relacionadas con la regulación de los ritmos circadianos sobre sus efectos. Por ejemplo, diversos β -bloqueantes (White y LaRocca, 2002), nitratos (Bode-Böger y Kojda, 2005) y bloqueantes de los canales de calcio (Stanton, 1998) han sido aplicados teniendo en cuenta la hora del día. A su vez, corticosteroides como la prednisolona (Scherholz, Schlesinger y Androulakis, 2019) y opioides como la morfina (Kervezee *et al.*, 2017), han sido aplicados en protocolos cronofarmacológicos, encontrando una mejora en la eficacia al tener en cuenta el horario del día en la administración.

El enfoque cronofarmacológico ha sido aplicado también a drogas oncológicas, teniendo en cuenta que los tejidos normales son sensibles a las drogas en general, entre ellas las anti-tumorales. Por lo tanto, uno de los objetivos de la cronoterapia oncológica es aprovechar las características diferenciales entre las células normales y tumorales para disminuir los efectos secundarios. Algunas de estas características son las distintas fases circadianas que pudiera haber entre

dichas células, determinando la sensibilidad diferencial a las drogas generada por mecanismos farmacocinéticos y dinámicos (White y LaRocca, 2002). Dentro de estos mecanismos diferenciales, pueden mencionarse la producción de concentraciones de metabolitos tóxicos en distintos momentos del día (White y LaRocca, 2002), o las variaciones circadianas en los mecanismos de defensa celular (Erkekoglu y Baydar, 2021). Por lo tanto, para que la toxicidad sobre las células normales sea mínima, y sobre las tumorales, máxima, en las terapias cronomoduladas se busca administrar la droga en el momento del día en que se presentan estas diferencias.

Buscando, entonces, no solo una mejora en la efectividad sino también una disminución de la toxicidad, el enfoque cronofarmacológico ha sido utilizado en los últimos 40 años para estudiar los efectos de drogas oncológicas en diversos tumores, obteniéndose diferencias sustanciales en la supervivencia de los pacientes, dependiendo del momento del día en que la droga fue administrada (Focan, 1995; Ballesta *et al*, 2017). Se ha estudiado el efecto de más de 30 medicamentos contra el cáncer en modelos murinos, en función de los horarios de administración, determinando que su eficacia puede variar en un 50% o más (Hill *et al.*, 2020). Granada *et al.* (2002) mostraron en un modelo de osteosarcoma de Glasgow murino, que tanto las drogas oxaliplatino como irinotecan poseen un efecto diferencial dependiendo del momento del día en que se administran. En seres humanos hay diversos ejemplos de drogas que han sido testeadas utilizando un enfoque cronofarmacológico. Por un lado, se ha visto que la utilización de la droga oxaliplatino en pacientes con metástasis colorrectal en un esquema cronoadministrado resultó en una mejor tasa de respuesta a la droga, dada por un descenso de 5 veces en la toxicidad sobre células normales (Levi *et al*, 1993).

Por su parte, Schmiegelow *et al.* (1997) compararon la eficacia de la administración matutina *versus* la vespertina de una combinación de metotrexato con 6-mercaptopurina en niños con leucemia linfoblástica aguda. Descubrieron que aplicando la combinación de drogas en la noche tenían una mejor probabilidad de sobrevida con remisión, que cuando se administraban por la mañana. Cuando se estudió la droga fluorodesoxiuridina (FUDR), también se obtuvieron resultados similares: cuando se aplica en un esquema cronofarmacológico, el fármaco mostró menor toxicidad que cuando se administra constantemente a pacientes con metástasis renal (Roemeling y Hrushesky, 1987). Con respecto a trabajos recientes, se han realizado administraciones de inhibidores de puntos de control inmunitarios (Rosseau *et al.*, 2023) en cáncer de pulmón y de radioterapia en cáncer hepatocelular (Yassine *et al.*, 2022), observándose en ambos casos mejoras en la efectividad al tener en cuenta el momento del día de administración. A su vez, se ha descrito que es posible mejorar la toxicidad de la combinación de fluorouracilo, leucovorina, irinotecan y oxaliplatino (conocida como mFOLFIRINOX) en pacientes con cáncer pancreático, a través de un registro circadiano de los efectos secundarios (Bouchahda *et al.*, 2023), mostrando que la cronoterapia y la cronofarmacología aún son un campo que necesita continuar siendo explorado en pos de mejorar la vida de los pacientes con cáncer.

Particularmente, en GBM se han estudiado algunas drogas y terapias bajo este enfoque. Por un lado, se ha estudiado en ratones la droga bortezomib, donde el tratamiento al comienzo de la noche, utilizando una concentración de dosis baja del fármaco, condujo a una inhibición del crecimiento tumoral en un 70%, frente a un 18% de inhibición si la droga se administra durante el día (Wagner *et al.*, 2021). A su vez, como ya fue explicado en la "Introducción general", la terapia actual para

el glioblastoma consiste en radioterapia, quimioterapia con temozolomida (TMZ) y remoción quirúrgica. Por un lado, la radioterapia fue estudiada administrándola durante el día o la noche en pacientes, sin encontrar diferencias en la sobrevida de éstos (Sapienza *et al.*, 2021). Por otra parte, la TMZ ha sido estudiada con un enfoque cronofarmacológico tanto *in vitro*, como en humanos. En células de GBM humanas se ha observado que su efectividad es mayor cuando se administra cerca del pico de *bmal1*, encontrándose mayor mortalidad celular en este punto (Slat *et al.*, 2017). Además, se ha demostrado que la expresión de MGMT, la proteína involucrada en la reparación del ADN frente al daño causado por TMZ (ver “Introducción general”), oscila circadianamente (Marchenay *et al.*, 2001; Martineau-Pivoteau *et al.*, 1996).

En humanos, la TMZ fue administrada en dos momentos del día, demostrándose que aquellos pacientes que reciben quimioterapia de día presentan mayor sobrevida que aquellos que la reciben de noche (Damato *et al.*, 2021; Damato *et al.*, 2022). Sin embargo, la TMZ es una droga que continúa sin brindar grandes avances en la sobrevida de los pacientes y con resultados inconclusos a nivel de cronoterapia (Petković *et al.*, 2023). Es por esto que la aplicación de un enfoque cronofarmacológico, combinado con la utilización de nuevas drogas que posean mejor efectividad, puede ayudar sustancialmente a mejorar la prognosis de pacientes con tumores y su calidad de vida mientras cursan la enfermedad, tan solo controlando el horario en que las mismas son administradas.

1.2 TMZ y la droga 1A-116

La TMZ es un agente alquilante de administración oral, que al ser ingerido se convierte espontáneamente en MTIC (5-(3-metiltriazenil)-imidazol-4-carboximida).

MTIC es escindido en el catión metil-diazonio (agente alquilante) y AIC (5-aminoimidazol-4-carboxamida). AIC es excretado en la orina mientras que el catión metil-diazonio transfiere grupos metilo a las bases guanina del ADN, transformándolas en O6-metilguanina (Figura 6.1) (Stupp *et al.*, 2005; Denny *et al.*, 1994). Durante la replicación del ADN, la base modificada se aparea con timina en lugar de citosina. Este apareamiento erróneo puede ser detectado por el sistema de reparación de ADN, y de no ser reparado por vías de reparación por recombinación, se induce apoptosis. Por ello, la acción de TMZ como quimioterápico, depende de que la célula se encuentre en proliferación (Fukushima *et al.*, 2009). La enzima O6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT), codificada en el gen *mgmt*, tiene un rol muy importante en los mecanismos de reparación del ADN. Como ya se mencionó en la “Introducción general”, el gen *mgmt* se encuentra hipermetilado en el 42% de los GBM primarios y en el 80% de los secundarios (ver inciso “Clasificación molecular de los glioblastomas”). Dicha metilación silencia la expresión del gen, por lo que esta característica es importante para el tratamiento con TMZ, ya que la enzima encargada de reconocer el apareamiento erróneo entre timina y metilguanina no se encuentra presente (Fukushima *et al.*, 2009). Pese a ser la droga utilizada actualmente para el tratamiento del GBM, la TMZ no ha brindado grandes avances en la supervivencia de los pacientes, y muchos glioblastomas continúan siendo resistentes tanto a la quimioterapia como a la radioterapia (Mekala *et al.*, 2023). Por lo tanto, se vuelve fundamental el desarrollo de nuevas terapias que tengan en cuenta la disminución de los efectos secundarios, así como también la determinación de blancos moleculares que conduzcan al desarrollo de un tratamiento que no afecte a las células normales del sistema nervioso.

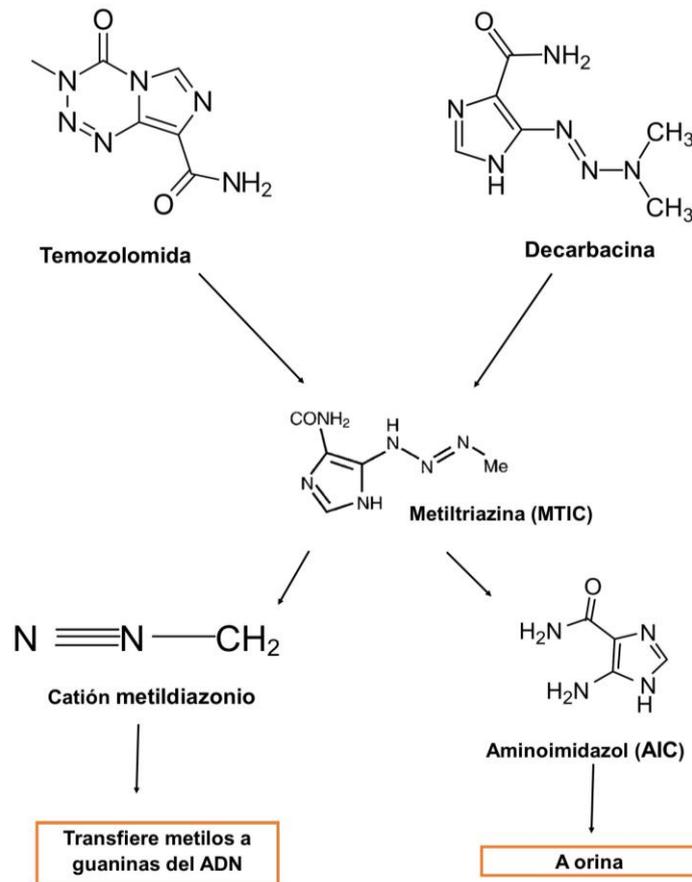


Figura 6.1. Conversión de TMZ al ingresar al organismo. La TMZ reacciona con decarbacina para convertirse en MTIC, el cual es escindido en catión metildiazonio y AIC. AIC se excreta en orina, mientras que el catión metildiazonio es el responsable de transferir metilos a las guaninas del ADN, interfiriendo en la replicación de las células, particularmente las tumorales.

Es por esta razón que hace unos años comenzó la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de los GBM, y la proteína Sustrato 1 de toxina botulínica C3 relacionada con Ras (Rac1) surgió como uno de ellos (Cardama *et al.*, 2014). Rac1 es un miembro de las Rho GTPasas, una familia de proteínas pequeñas (21-25 kDa) que poseen entre 190-250 residuos aminoácidos, cuentan con un dominio GTPasa y una extensión C-terminal corta (Hodge y Ridley, 2016). Se activan sólo frente a la unión a guanosin trifosfato (GTP), estando inactivadas,

por ende, al unirse a guanosin difosfato (GDP). El intercambio de GDP por GTP es llevado a cabo por los Factores Intercambiadores de Guanina (GEFs, por sus siglas en inglés), los cuales actúan “río arriba” de diversos factores de crecimiento, citoquinas e interleuquinas. A su vez, la conversión de GTP por GDP para que la proteína vuelva a su estado inactivo es llevada a cabo por las proteínas activadoras de GTPasa (GAPs, por sus siglas en inglés), quienes hidrolizan el GTP.

Entre las funciones de esta familia proteica, pueden mencionarse la migración, proliferación y adhesión celular, además de una gran variedad de funciones asociadas a la remodelación del citoesqueleto celular (Parri y Chiarugi, 2010). Dentro de la familia de Rho GTPasas, las proteínas más caracterizadas son Rho, Rac (1, 2 y 3) y Cdc42. Rac1 se expresa de forma ubicua, mientras que Rac2 y 3 se expresan solo en células hematopoyéticas. La GTPasa Rac1 puede ser activada por diferentes GEFs entre los que se incluyen Tiam (1, 2), Pix (α , β) (Rossman *et al.*, 2005; Hart *et al.*, 1994), Trio, Ect2, y Vav3 (Salhia *et al.*, 2008), estando los últimos tres sobreexpresados en los GBM. Dichos GEFs se dividen en dos grandes familias: Dock 180 (GEFs no convencionales), y Dbl (GEFs convencionales). Dentro de esta última familia se encuentra la proteína 1 inductora de invasión y metástasis de células T de linfoma (TIAM1). Tanto los GEFs del tipo Dbl como los Dock 180 requieren la interacción con el residuo Trp56 en la superficie de Rac1 para actuar (Karnoub *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2011). Por otro lado, se demostró que el GEF Tiam1 requiere la interacción con diversos factores, entre ellos la quinasa PI3 (PI3-K) (Sander *et al.*, 1998).

Rac1 se encuentra sobreexpresada en una gran variedad de tumores (Ma *et al.*, 2023) y se hipotetiza que contribuye a la proliferación tumoral mediante la

desregulación del ciclo celular estimulando la expresión de la Ciclina D (Sanz-Moreno *et al.*, 2008). A su vez, contribuye a la invasión tumoral regulando la producción de metaloproteasas (MMPs), enzimas que poseen la capacidad de degradar la matriz extracelular (Lozano *et al.*, 2003) y cuya variación diaria ya ha sido reportada (Agostino *et al.*, 2002); así como también a través de la regulación del proceso de formación de lamelipodios celulares reorganizando la polimerización de actina. Por lo tanto, la desregulación de Rac1 cumple un rol fundamental, tanto en el desarrollo como en la progresión tumoral (Liang *et al.*, 2021).

Existen antecedentes sobre la utilización de la vía de Rac1 como blanco farmacológico. En particular, la inhibición de Rac1 mediante compuestos que impidan la interacción con los GEFs Tiam1 y Trío, es una estrategia que ya ha sido utilizada para la generación de fármacos exitosos. El primer compuesto descrito con esta característica fue NSC2376, el cual inhibe la activación de Rac1 al unirse a su superficie, impidiendo la interacción con dichos GEFs (Gao *et al.*, 2004). En los últimos años, se han descrito nuevos inhibidores de Rac1, los cuales cuentan con una mejor efectividad. Entre ellos, se puede mencionar, por un lado, a EHT 1864 (Shutes *et al.*, 2007), y por otro, a 1D-142, el que además de interferir en la unión de Rac1 con sus GEFs, reduce la translocación nuclear de NF- κ B, mediada por Rac1 durante la proliferación y migración celular (Ciarlantini *et al.*, 2021). Dentro de estos compuestos, se encuentra también 1A-116, el cual fue descrito por Cardama *et al.* (2014) en un trabajo realizado sobre inhibidores de la proteína Rac1. En dicho trabajo se reportó el efecto de ZINC69391, un inhibidor novedoso y específico de Rac1.

1A-116 surge como un análogo estructural de ZINC69391, mostrando un mayor efecto anti-proliferativo y anti-migratorio sobre las líneas celulares de glioma U-87 y LN-229. En el diseño *in silico*, se ha observado que tanto ZINC69391 (Figura 6.2 A) como 1A-116 (Figura 6.2 B) son moléculas que interfieren con la unión de Rac1 a sus GEFs, bloqueando el residuo Trp65. ZINC69391 bloquea tanto la unión de Rac1 a Tiam1 como a Dock-180, mientras que 1A-116 bloquea la unión de Rac1 a los GEFs de la familia vav y Dbl (Figura 6.3). Ambas drogas ingresan a la célula de forma directa atravesando la membrana, debido a su bajo peso molecular y a su capacidad liposoluble. ZINC69391 mostró una disminución significativa de la proliferación y migración de las líneas celulares de GBM LN-229 y U87, así como también un arresto en fase G1 del ciclo celular y un aumento de la apoptosis.

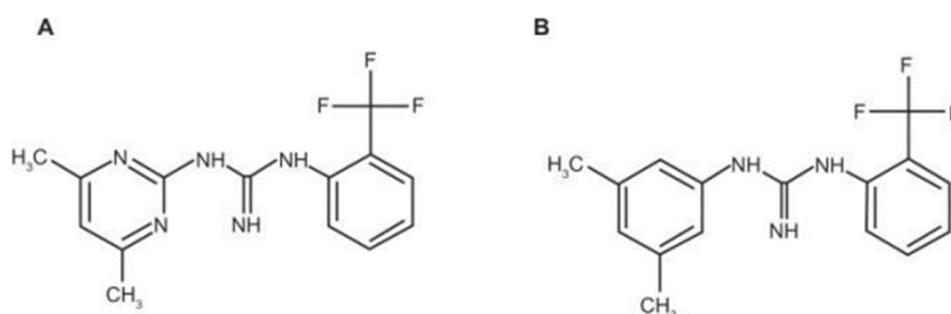


Figura 6.2. Estructura química de A) ZINC69391 y B) 1A-116.

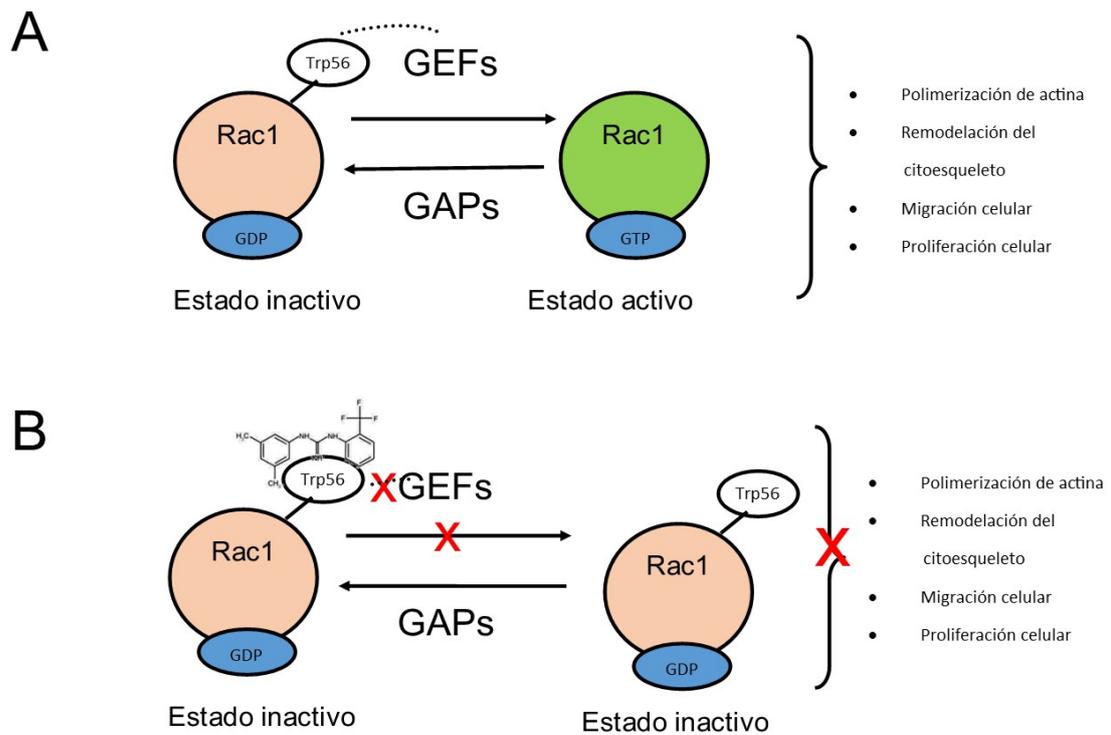


Figura 6.3. Mecanismo de acción de 1A-116. (A) Mecanismo de activación de Rac1. La proteína Rac1 se encuentra en estado inactivo al estar unida a GDP. La unión de los GEFs al Trp56 superficial de la proteína provoca la conversión de GDP por GTP, lo cual permite la transición de Rac1 al estado activado, promoviendo procesos como la remodelación del citoesqueleto, la migración y la proliferación celular. Por otro lado, los GAPs son los encargados de hidrolizar el GTP para que Rac1 vuelva a su estado inactivo. (B) La droga 1A-116 bloquea de forma específica el Trp56 superficial en Rac1, generando que los GEFs no puedan unirse, por lo que no se produce la conversión de GDP por GTP, la proteína no se activa, y se bloquean los procesos de migración, remodelación del citoesqueleto celular y proliferación.

Por otro lado, 1A-116 mostró el doble de inhibición que ZINC69391 sobre la proliferación y migración en las líneas celulares de GBM (Cardama *et al.*, 2014), posicionándose como un inhibidor de Rac1 más eficiente. Teniendo en cuenta estos resultados, llevar a cabo un estudio cronofarmacológico de 1A-116 para determinar

si existen horarios de máxima efectividad, puede contribuir a mejorar aún más el tratamiento con dicha droga, apuntando a mejorar los tratamientos del GBM con una droga novedosa aplicada con un enfoque cronofarmacológico. Cabe destacar que si bien se han descrito oscilaciones en MGMT y otras proteínas celulares asociadas al tratamiento con TMZ en GBM (Slat *et al.*, 2017; Marchenay *et al.*, 2001; Martineau-Pivoteau *et al.*, 1996), hasta el momento no ha sido descrita la oscilación circadiana de Rac1 ni de sus GEFs en GBM, por lo tanto, estudiar la misma puede colaborar en un enfoque cronofarmacodinámico ajustado a las posibles oscilaciones de los blancos de 1A-116.

Por lo tanto, en el presente capítulo se estudiará la droga novedosa 1A-116 y la droga utilizada actualmente, TMZ, ambas con un enfoque cronofarmacológico, a modo de comparar sus efectividades en distintos momentos del día, tanto *in vitro*, como *in vivo*.

2. Hipótesis y objetivos

Teniendo en cuenta lo expuesto en la “Introducción” del presente capítulo, se evidencia que el reloj circadiano modula la efectividad y toxicidad de diversas drogas. La cronofarmacología surge entonces como una herramienta para mejorar los tratamientos de los pacientes tan solo determinando el momento de administración. **Bajo la hipótesis de que la acción de las drogas quimioterapéuticas TMZ y 1A-116 es modulada por el sistema circadiano**, el objetivo general del presente capítulo fue **realizar el estudio cronofarmacológico *in vitro* e *in vivo* de las drogas oncológicas TMZ y 1A-116**, teniendo como objetivos específicos:

- Determinar si los blancos de la droga 1A-116 presentan una oscilación circadiana.
- Analizar la dependencia horaria en el efecto de ambas drogas oncológicas *in vitro*, evaluando procesos celulares como proliferación, apoptosis y migración.
- Analizar la dependencia horaria en el efecto de ambas drogas oncológicas *in vivo*, administrándolas en diferentes horarios del ciclo LO.

3. Materiales y metodología

Experimentos *in vitro*

3.1. Experimentos con 1A-116 y sus blancos

3.1.1. Expresión de ARNm de Tiam1 y Rac1

Las extracciones y las condiciones de PCR fueron las indicadas en el apartado "Materiales y métodos generales". Se realizaron curvas con distintas concentraciones de ADNc molde y cebadores, para calcular la eficiencia de amplificación de dichos cebadores, seleccionando las siguientes concentraciones: Actina 0.4 μ M, Tiam 0.2 μ M, y Rac1 0.5 μ M.

La secuencia de los cebadores utilizados es:

Rac1 *forward*: 5'- GTGCAGACACTTGCTCTCCT -3'

Rac1 *reverse*: 5'- AATGGCAACGCTTCATTCGG -3'

Tiam1 *forward*: 5'- TGCCGTGTTCTGACTTACC-3'

Tiam1 *reverse*: 5'- ACATGAATCGCCACCCTCTC-3'

Actina *forward*: 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'

Actina *reverse*: 5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGA-3'.

3.1.2. In-cell western de TIAM1

Se analizó la expresión de la proteína TIAM1 siguiendo el protocolo indicado en “Materiales y Métodos generales”. Se utilizó el anticuerpo monoclonal TIAM1 (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU) acoplado a Alexa 488 en una dilución 1/500.

3.1.3. Preparación de solución stock de 1A-116

La droga 1A-116 (peso molecular 307,31 g/mol) fue generosamente provista por el Laboratorio de Oncología Molecular de la Universidad Nacional de Quilmes. Se calculó la cantidad de droga necesaria y se resuspendió la cantidad total en el volumen final correspondiente de Agua Destilada Apirógena Estéril (ADAE, Roux-Ocefa, Argentina). Posteriormente, se procedió a agregar lentamente HCl 100 mM hasta llegar a un pH de aproximadamente 1. Esto se llevó a cabo para lograr la protonación de 1A-116 y su consecuente solubilización. Una vez lograda la solubilización, se adicionó muy lentamente NaOH 144 mM, para evitar la precipitación de la droga, hasta alcanzar un pH de 5,5. El preparado fue siempre de 200 μ M, el cual fue diluido para obtener las concentraciones correspondientes en cada experimento.

3.1.4. Determinación de la concentración inhibitoria cincuenta (IC₅₀) de 1A-116 sobre la proliferación de LN229.

Se sembraron 3×10^3 células de la línea LN229 por *well*, en una placa de 96 wells. Luego de 24 horas, se trató a las células con las siguientes concentraciones de 1A-116 por *well*: 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 50 μ M o 100 μ M. Los controles del experimento fueron células tratadas con agua apirógena estéril como vehículo (Veh). A las 72 horas de tratamiento se adicionó cristal violeta 0,1% a cada *well* y se registró la absorbancia a 570 nm con un espectrofotómetro (Elx800, Biotek) de

placa de 96 *wells*. Para calcular el valor de IC50, se realizó un análisis de ajuste a un modelo no lineal para curvas de dosis-respuesta inhibitorias (modelo de decrecimiento exponencial).

3.1.5. Evaluación de posibles efectos sincronizadores de la droga 1A-116 sobre las células LN229 mediante registros de bioluminiscencia

Se llevaron a cabo las transfecciones y registros según lo indicado en “Materiales y Métodos generales”. A un grupo de placas se les agregaron 20 μM de 1A-116, mientras que al otro grupo se le adiciono vehículo. La adición de la droga se llevó a cabo en 0 HPS, horario de mínima efectividad de la droga (ver sección 3.2.6), para evitar que las células mueran durante el registro. Se registraron los ritmos celulares por medición de bioluminiscencia acoplada a la activación del promotor de *bmal1* en el lector de luminiscencia Kronos Dio (ATTO). Dentro del equipo se mantuvo a las células a 37 °C, sin inyección de CO₂. El equipo registró datos en tiempo real de cada *well* durante 6 minutos, con un intervalo de 30 minutos entre registros.

3.1.6. Modulación cronofarmacológica del efecto de 1A-116 sobre la proliferación de LN229 y LN229E1

Se sembraron $2,5 \times 10^3$ células de la línea LN229 por *well* en una placa de 96 *wells*. Luego de 24 horas, se procedió a la sincronización del reloj circadiano de los diferentes cultivos mediante *shock* de SFB (50% SFB) durante dos horas, obteniéndose los horarios 0, 5, 10, 15, 20 o 25 HPS, es decir, en intervalos de 5 h durante 25 h. Una vez sincronizado el último cultivo, las células fueron tratadas con vehículo, 20 μM o 40 μM de 1A-116. A las 72 horas de tratamiento, se estimó el número de células viables mediante coloración con cristal violeta 0,1% y se registró la absorbancia a 570 nm con un espectrofotómetro (Elx800, Biotek).

Usando el mismo ensayo, se realizaron experimentos de evaluación de la proliferación de las células LN229 y LN229E1 tratadas con 10, 20, 40, 50 o 100 μM de 1A-116, a 10 y 23 HPS (máximo y mínimo de efectividad de 1A-116 evaluada en el experimento anterior, ver sección “Resultados”). Los datos obtenidos se analizaron y ajustaron a curvas de dosis-respuesta generadas por un ajuste no lineal utilizando la función de dosis-respuesta de pendiente variable de Hill, utilizando el programa OriginPro9 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EE.UU.), obteniendo así los valores de la concentración inhibitoria cincuenta (IC50) para cada fenotipo y horario.

3.1.7. Ensayo cronofarmacológico del efecto tóxico de 1A-116 sobre LN229

Se sembraron $2,5 \times 10^3$ células/*well* en una placa de 96 *wells*. 24 horas después, se procedió a la sincronización celular en los horarios de máxima y mínima efectividad de 1A-116 (10 y 23 HPS). Luego de 4 horas, las células fueron tratadas con 5, 10, 20, 40 o 100 μM de 1A-116. Para establecer el tiempo de tratamiento mínimo necesario para observar una inhibición del crecimiento celular, los cultivos fueron incubados durante 4, 8 o 16 h con la droga o vehículo, definiéndose la toxicidad como el efecto que la droga posee sobre la viabilidad celular, en tiempos menores a 24 h (es decir, tiempos menores que el tiempo de duplicación de esta línea celular).

Finalmente, se llevó a cabo el revelado de la coloración con cristal violeta 0.1%, y se registró la absorbancia a 570 nm con un espectrofotómetro (Elx800, Biotek) de placa de 96 wells.

3.1.8. Ensayo cronofarmacológico del efecto de 1A-116 sobre la migración de LN229.

Se sembraron $2,5 \times 10^5$ células LN229 y se sincronizaron mediante *shock* de SFB en placas de 12 *wells* provistas de un tapón de elastómero de silicona de 3,5 mm (Sylgard 184) adherido al centro de cada *well*. A excepción de los controles técnicos (t_0), los tapones de silicona de todos los pocillos se quitaron en el momento del tratamiento para generar un área libre de células a la que pudieran migrar las células circundantes. Las células se trataron con 1A-116 ($10 \mu\text{M}$) o vehículo a 10 HPS o 23 HPS. 16 h después la migración celular fue medida marcando a las células con Calceína AM y obteniendo fotos en el equipo Cytation 5 (Biotek Instruments) con un objetivo de 2,5 X y con el canal GFP (488/520 nm). Debido a que 1A-116 tiene efectos sobre la proliferación y la apoptosis, el tiempo permitido para que las células migren fue suficiente para que invadieran el área libre de células manteniendo al mínimo el número de divisiones celulares. 1 hora antes de la cuantificación, se quitaron los tapones de los tres pocillos t_0 , se promediaron los resultados, y se restaron de las mediciones de todos los demás *wells* para tener en cuenta las células que podrían desprenderse estocásticamente y caer en el área libre de células. En cada imagen, se seleccionaron dos regiones de interés, una en el centro del área libre de células y la otra fuera, donde la monocapa celular estaba intacta (sin tapón). Esto permitió medir las células en el área de migración en relación con las células del exterior, teniendo en cuenta los posibles efectos del número de células disponibles para ingresar al área de migración. Todas las imágenes fueron analizadas utilizando el *software* ImageJ.

3.1.9. Ensayo cronofarmacológico del efecto de 1A-116 sobre la apoptosis temprana de LN229.

Se sembraron 3×10^3 células LN229/*well* en placas de 96 *wells*. Después de 24 h, las células se sincronizaron y se trataron durante 6 h con 20 o 50 μM de 1A-116, o vehículo, a 10 HPS o 23 HPS. La apoptosis temprana se midió utilizando anexina V marcada con fluorescencia, una proteína de unión a fosfolípidos con una alta afinidad por la fosfatidilserina que está presente en la superficie externa de la membrana celular en las células apoptóticas. Se utilizó el kit Alexa Fluor 488 Annexin V (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada medición se realizó con un lector de imágenes Cytation 5 (Biotek Instruments, EE.UU.) con un objetivo de 10x y canales DAPI (360/460 nm) y GFP (488/520 nm).

3.2. Experimentos con Temozolomida

3.2.1. Modulación cronofarmacológica del efecto de TMZ sobre la proliferación de las células LN229

Se sembraron 80.000 células/*well* de LN229 en una placa de 12 *wells* usando una placa por HPS. Las células fueron sincronizadas mediante *shock* de suero con 50 % SFB durante dos horas, seguido de un cambio de medio. Esto fue realizado cada cuatro horas, durante 28 h, es decir, a las 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 HPS. Luego, las células de cada horario fueron tratadas con las siguientes concentraciones de TMZ: 1, 10, 50, 100, 200 o 1000 μM o vehículo (Dimetil sulfóxido 0,2%, DMSO). Después de 72 h, las células fueron fijadas con metanol frío ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) durante 10 minutos, se lavaron una vez con 1x PBS, y se aplicó DAPI $2\mu\text{g/mL}$. Las placas se leyeron inmediatamente después utilizando un lector de placas fluorescentes a 360/460 nm (Thermo Fisher, Luminoskan, EE. UU). Las medidas de

DAPI (unidades fluorescentes relativas, RFU) se convirtieron en número de células usando una curva de calibración realizada en placas de 12 *wells* con células LN229, siguiendo la ecuación $Y = 0.0096X + 1968$. Finalmente, el número de las células para cada tratamiento se relativizaron al vehículo (DMSO, 0,2 %) en cada HPS y se expresaron como porcentaje de supervivencia.

Experimentos *in vivo*

3.3. Experimentos con 1A-116

3.3.1. Sobrevida de ratones *nude* frente a la administración de 1A-116 en dos horarios

Los animales fueron divididos en dos grupos y se les administró 1A-116 en una concentración de 20 mg/kg diarios disueltos en 200 μ l de vehículo por vía intraperitoneal en ZT3 a un grupo y en ZT12 al otro, siendo ZT0 el momento de encendido de las luces (*onset*). Se administraron 200 μ l de vehículo diarios a los animales control. Se llevó a cabo un análisis de sobrevida de los ratones, observando la aparición de síntomas del GBM (ya descritos en “Materiales y Métodos generales”), los cuales determinaron el punto final experimental.

3.4. Experimentos con TMZ

3.4.1. Sobrevida de ratones *nude* frente a la administración de TMZ en dos horarios

La TMZ (Sigma-Aldrich) fue disuelta en DMSO para preparar una solución madre de 50 mg/ml (Sigma-Aldrich). Posteriormente, el *stock* se diluyó en PBS 1x según el peso del ratón para lograr una dosis de 70 mg/kg con menos de 10%

DMSO. Se utilizó una aguja de sonda de punta redonda de acero inoxidable de 25 mm, 22G con ángulo de ~45°. Se utilizó una aguja para TMZ y otra para vehículo, las cuales fueron limpiadas y almacenadas en etanol 70%. La administración de TMZ y vehículo fue llevada a cabo por vía oral mediante *gavage*, anestesiando a los ratones brevemente con isoflurano al 2%, administrado entre 200-400 µl de solución dependiendo del peso del ratón. El tratamiento se inició el día 12 post implante, momento en el cual se comenzó a detectar bioluminiscencia significativa en el tumor. Tanto la droga como el vehículo fueron administrados a los ratones en dos horarios: ZT1 o ZT11, siguiendo un esquema cinco-dos, es decir cinco días de tratamiento y dos de descanso, de acuerdo con lo que se realiza en humanos. Este protocolo se repitió hasta el punto final experimental de pérdida de >10 % del peso, momento en el cual los ratones fueron perfundidos para histología.

3.4.2. Registros de bioluminiscencia *in vivo* del crecimiento tumoral.

Ratones *nude* machos y hembras fueron implantados con células LN229-Bmal1*luc*, según sección 3.4.2, con la salvedad que los animales permanecieron en recuperación durante cinco días bajo tratamiento de carprofeno 5 mg/kg. Posteriormente a la implantación, las imágenes de bioluminiscencia fueron colectadas cada 2 días a ZT5 (máximo de *bmal1*) para realizar un seguimiento del crecimiento tumoral, utilizando el equipo In Vivo Imaging System Lumina III (IVIS, Perkin Elmer, EE. UU.). Previamente a cada medición, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de isoflurano 2% (Piramal) vaporizado en 200 ml/min de oxígeno e inyectados subcutáneamente con luciferina (Goldbio) filtrada a una concentración de 150 mg luciferina/kg.

Las imágenes de bioluminiscencia se analizaron utilizando el Living Software de imagen (Perkin Elmer, EE. UU). A las cuentas de bioluminiscencia obtenidas correspondientes al área tumoral, se les restó la bioluminiscencia basal (un ROI por fuera del área del tumor), para cada ratón.

3.4.3. Inmunohistoquímica

Para llevar a cabo el análisis del área tumoral, se utilizó el marcador Ki67. Las inmunohistoquímicas se llevaron a cabo siguiendo lo descrito en “Materiales y métodos generales”, utilizando el anticuerpo primario 1/1000 Ki67 (Abcam, EE. UU.) y 1/500 del anticuerpo secundario anti-conejo Alexa 555 (Abcam, EE. UU.). Las mediciones se realizaron con el microscopio Zeiss Axio Observer D1 Inverted (Zeiss, EE. UU) con objetivos de 2,5 X y 10 X y TRITC (488/532) y DAPI (360/460).

3.5. Análisis de resultados

3.5.1. Adquisición y procesamiento de imágenes

Las imágenes se procesaron con el *software* de análisis de imágenes Fiji (Schneider *et al.*, 2012). Se obtuvieron imágenes sin procesar para confirmar cualitativamente los patrones de tinción. Las mediciones de intensidad solo se realizaron en las imágenes correspondientes a los experimentos de migración. Para cada experimento, las imágenes se procesaron para ayudar a la visualización de la siguiente manera: primero, se aplicaron filtros *unsharp mask* y *despeckle* a los canales separados simultáneamente. A continuación, todos los canales se fusionaron en una sola imagen de tipo color RGB.

Para los experimentos de migración, las imágenes fueron adquiridas y unidas automáticamente por el software GEN5 y fueron procesadas con Fiji. Antes de

aplicar los filtros *unsharp mask* y *despeckle*, se utilizó una corrección de campo plano para eliminar los efectos de cuadrícula generados por el proceso de unión.

Las imágenes de bioluminiscencia se analizaron utilizando el Living Software de imagen (Perkin Elmer, EE. UU).

3.5.2. Análisis estadístico.

Para analizar la significancia estadística de los datos, se realizaron las pruebas paramétricas: prueba t de Student, ANOVA de una vía, ANOVA de dos vías y ANOVA tres vías, considerando significativas a un $p < 0.05$.

Para los datos derivados de los experimentos de análisis de ARNm de Tiam1 y Rac1, los análisis de la proteína TIAM1 y el ritmo de efectividad de 1A-116, la presencia de ritmos circadianos fue evaluada mediante la función Meta2d, como se indica en “Materiales y Métodos generales”.

Los tiempos de supervivencia de los ratones con tumores tratados con TMZ o 1A-116 se analizaron utilizando las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, que luego se compararon mediante una prueba no paramétrica de rango logarítmico.

4. Resultados

4.1. Cronofarmacología de la droga 1A-116

4.1.1. Tiam1 presenta una oscilación circadiana a nivel de ARNm y proteína en LN229

Como ya fue descrito en la “Introducción” del presente capítulo, la droga 1A-116 bloquea, específicamente la unión de Rac1 a sus GEFs, particularmente, Tiam1. Por otro lado, la modulación circadiana de la expresión de Rac1 o Tiam1 podría dar lugar a variaciones dependientes del tiempo en los efectos de los

fármacos que se dirigen a las vías en las que esta proteína desempeña un papel. La oscilación de estas proteínas no fue nunca demostrada en GBM, por lo tanto, se procedió a evaluar si dichos blancos presentan oscilaciones circadianas, midiendo los niveles de ARNm y proteínas en cultivos de LN229 y LN229E1 sincronizados cada 4 h durante 24 h. Tiam1 mostró un ritmo circadiano significativo en LN229, el cual se pierde en las células LN229E1 (Figura 7.1 A) (Tiam1 LN229: JTK: periodo de 24 h, $p < 0,05$, LS: ns, Meta2d: periodo de 23,7 h, $p < 0,05$. Tiam1 LN229E1: Periodo: JTK: ns, LS: ns, Meta2d: ns). Por otro lado, no se observó ningún ritmo para los niveles de Rac1 (Figura 7.1 B) ni en células LN229 ni LN229E1 (Rac1: JTK: ns, LS: ns, Meta2d: ns).

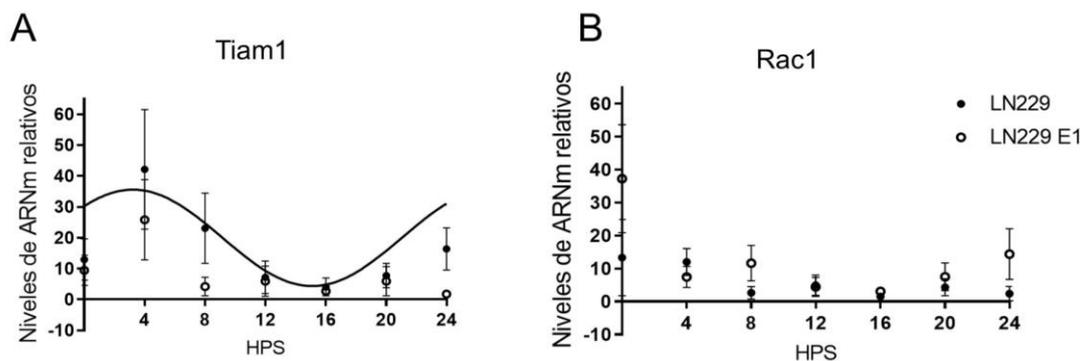


Figura 7.1. Ritmos circadianos en los niveles de ARNm de Tiam1 y Rac1 en las células LN229 y LN229E1. Después de la sincronización con SFB, las células se fijaron a intervalos de 4 horas y se extrajo su ARNm. La qPCR se realizó con cebadores para (A) Tiam1 y (B) Rac1 para determinar la cantidad de niveles de dichos ARNm en relación con los niveles de ARNm de actina. (A) En las células LN229, los niveles de ARNm de Tiam1 muestran ritmos circadianos significativos (Media \pm ESM, n=4, Tiam1: JTK: 24 h periodo, $p < 0,05$, LS: ns, Meta2d: 23.7 h periodo, $p < 0,05$. Rac1: JTK: ns, LS: ns, Meta2d: ns). los cuales se pierden en las células LN229E1 (Período: JTK: ns, LS: ns, Meta2d: ns). (B) Los niveles de ARNm de Rac1 no presentan ritmos circadianos en ninguno de los tipos celulares (JTK: ns, LS: ns, Meta2d: ns).

Mediante *in-cell westerns*, se observó que las células LN229 también mostraron una variación circadiana significativa en la expresión de TIAM1 con niveles máximos de expresión observados a las 8 HPS, y niveles mínimos a las 20 HPS, en antifase con la expresión de BMAL1 (Figura 7.2) (JTK: período de 24 h, $p > 0,0001$, LS: período de 23,8 h, $p < 0,01$, Meta2d: período de 23,9 h, $p > 0,0001$). La ritmicidad no fue observada en las células LN229E1 (JTK: ns, LS: ns, Meta2d: ns) (Figura 7.2 A). La figura 7.2 B muestra imágenes representativas de la tinción con TIAM1 para 9 y 21 HPS.

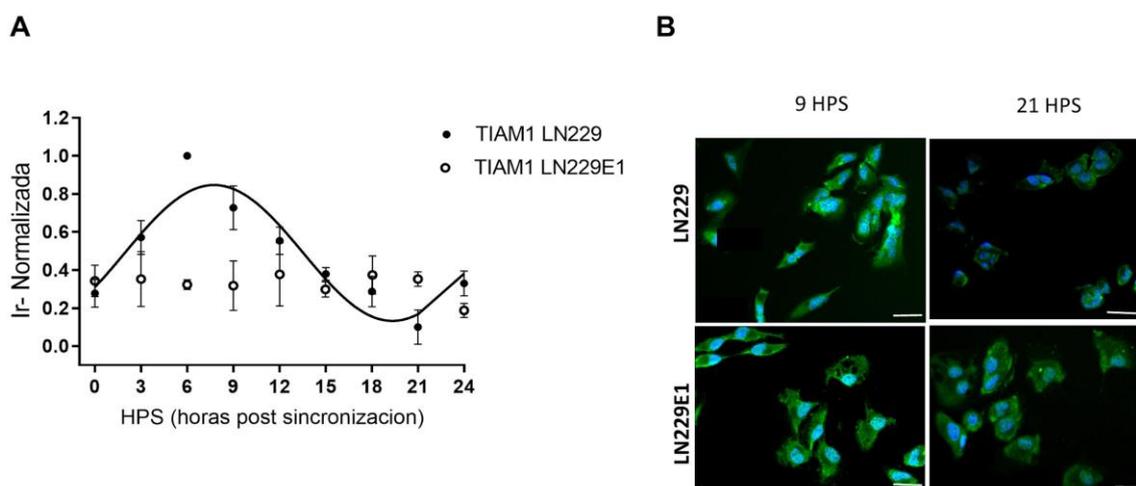


Figura 7.2. TIAM1 presenta una oscilación circadiana en las células LN229. Después de la sincronización con SFB, las células se fijaron a intervalos de 3 h y se procesaron para inmunocitoquímica de TIAM1 (canal verde) y los núcleos se contrastaron con DAPI (canal azul) (A) Se observa que la inmunoreactividad de TIAM1 fue circadiana LN229 (período 24h; JTK: $p < 0,01$, LS: ns, meta2d: $p < 0,0001$). No se observaron ritmos circadianos en LN229E1 (JTK: ns, LS: ns, meta2d: ns). (B) Imágenes representativas obtenidas con el sistema Cytation 5, que se utilizó para confirmar cualitativamente los resultados de tinción en células LN229 y LN229E1. Las barras de escala representan 20 μm .

Los resultados obtenidos tanto para los niveles de ARNm como de proteína indican que TIAM1 está modulado por un reloj circadiano funcional en las células de glioma LN229, mientras que Rac1 no mostró una expresión circadiana.

4.1.2. 1A-116 presenta un ritmo de efectividad en las células LN229, pero no en las LN229E1

Con el fin de determinar el rango de concentraciones efectivas de la droga 1A-116 sobre la proliferación de células LN229, se realizó una curva de dosis-respuesta de acuerdo con el protocolo mencionado anteriormente. Se observó que a concentraciones crecientes de 1A-116, la proliferación de los cultivos disminuyó significativamente ajustándose a un modelo no lineal para curvas de dosis-respuesta inhibitorias (modelo de decrecimiento exponencial). La IC50 obtenida para 1A-116 en la línea celular LN229 fue de $12,80 \pm 0,45 \mu\text{M}$ (Figura 7.3). Por lo tanto, para ensayos posteriores se utilizó una concentración de $20 \mu\text{M}$ de 1A como IC50 aproximada.

Una vez obtenido la IC50, se procedió a determinar si existe una respuesta rítmica al tratamiento con 1A-116 en distintos horarios, buscando si existen horarios de máxima y mínima efectividad. Dado que se observó la modulación circadiana de la expresión de TIAM1 (Fig. 7.1 y 7.2), blanco de la droga 1A-116, planteamos la hipótesis de que los efectos de 1A-116 deberían mostrar ritmos circadianos relacionados con la oscilación circadiana de TIAM1. Para probar esta hipótesis, se procedió a sincronizar el reloj molecular de las células mediante *shock* de suero, y se las trató con 1A-116 $20 \mu\text{M}$ (la IC50) o vehículo cada 5 h durante 25 h, a 0, 5, 10, 15, 20 y 25 HPS.

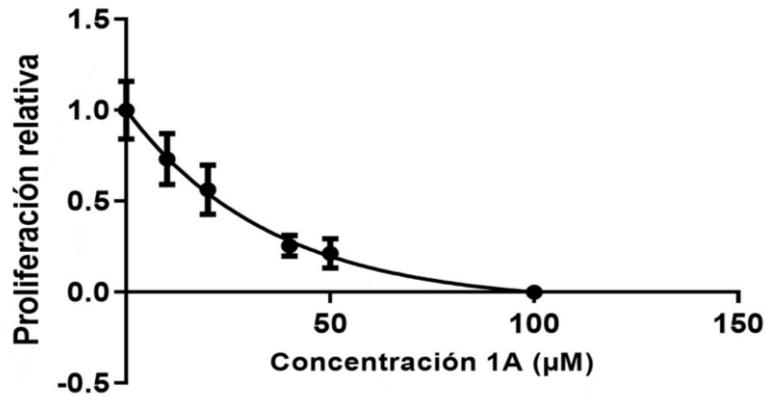


Figura 7.3 Determinación de la IC50 de 1A-116 a en LN229. Datos en Media \pm EEM. Se grafica en el eje vertical la proliferación relativa al control (Veh), en el eje horizontal la concentración de 1A-116. Concentraciones utilizadas: 10, 20, 40, 50 y 100 μ M. Ajuste estadístico exponencial del tipo *one-phase decay*. R^2 : 0,661.

Posteriormente, se evaluaron los ritmos circadianos de las células LN229 mediante bioluminiscencia con el plásmido pGL3-Bmal1-dLuc frente al agregado de 1A-116. Se observa que la oscilación circadiana en la activación del promotor de *bmal1* no se ve alterada frente al agregado de 20 μ M de droga en 0 HPS, presentando valores de acrofase y periodos similares al control con vehículo (LN229: Periodo: 23.8 ± 0.5 h, Acrofase: 19.5 ± 0.6 HPS. LN229 con 1A-116: Periodo: 24 ± 0.8 h, Acrofase: 20 ± 0.2 HPS), lo cual indica que la droga no está actuando como sincronizador sobre las células LN229 (Figura 7.4).

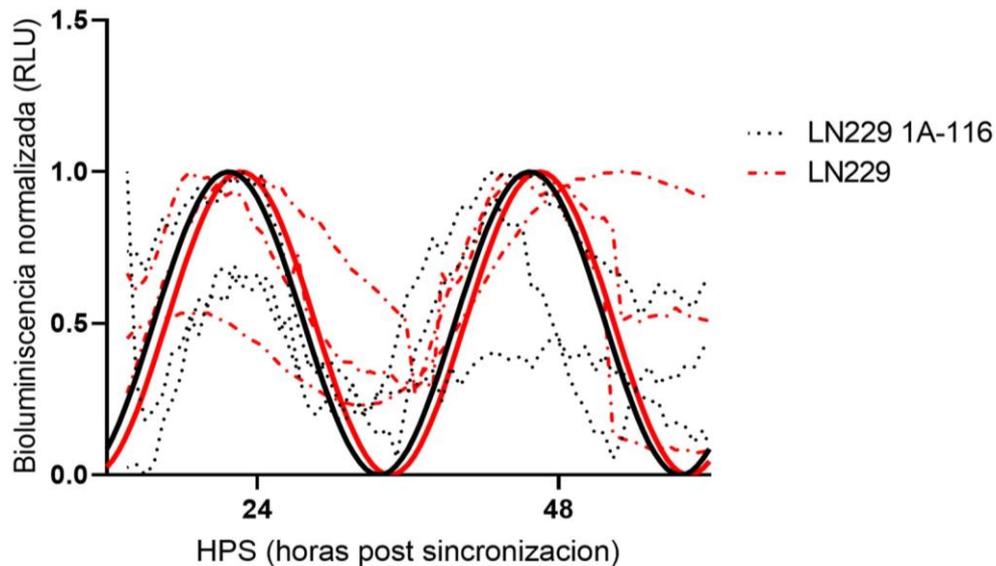


Figura 7.4 Las células LN229 no alteran su ritmo circadiano en la actividad de *bmal1* frente al agregado de 1A-116. Bioluminiscencia normalizada de *bmal1* en las células LN2299 durante 60 h (LN229: Periodo: 23.8 ± 0.5 h, CC: 0.94, Acrofase: 19.5 ± 0.6 HPS. LN229 con 1A-116: Periodo: 24 ± 0.8 h, CC:0.92, Acrofase: 20 ± 0.2 HPS). Las líneas negras punteadas indican las oscilaciones individuales correspondientes a LN229 con el agregado de $20 \mu\text{M}$ de 1A-116, mientras que la línea negra llena indica la oscilación promedio ajustada. La línea roja indica la oscilación promedio ajustada de LN229 sin droga. n=3.

Posteriormente, se trató a las células con la droga 1A-116 en distintos horarios de manera tal de evidenciar si existe una respuesta circadiana en la efectividad de la droga. Al momento de la medición, los cultivos tratados con vehículo estaban cerca de convertirse en monocapas confluentes, a diferencia de los tratados con 1A-116. Se observó un ritmo circadiano en la respuesta de la proliferación de LN229 frente al agregado de $20 \mu\text{M}$ de 1A-116, no siendo así para $40 \mu\text{M}$, que presenta alrededor del 60% de inhibición de la proliferación en todos los HPS (Fig. 7.5). Se observaron efectos inhibidores máximos a 10 HPS y mínimos a 23 HPS, con una periodicidad circadiana significativa (JTK: período de 25 h,

$p < 0,001$, LS: 26,02 período h, $p < 0,01$, Meta2d: período 25.5 h, $p < 0,0001$). El punto máximo observado es similar al observado para la expresión máxima de TIAM1 (9 HPS, ver Figura 7.2).

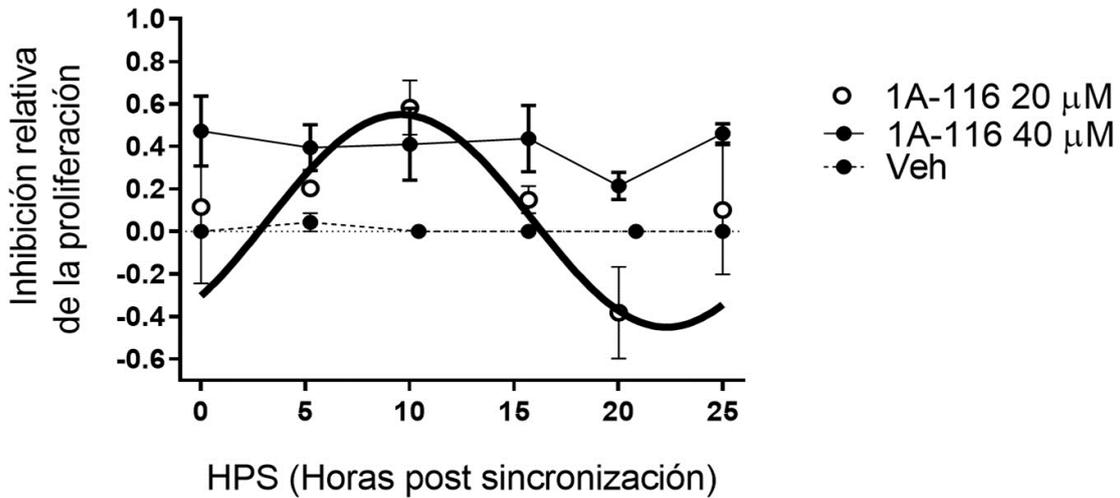


Figura 7.5. Variación circadiana del efecto de 1A-116 sobre la proliferación en la línea celular de glioblastoma LN229. Inhibición de la proliferación relativa a las células tratadas con vehículo. La evaluación se realizó con tinción de cristal violeta al 0,1%, 72 horas después de administrar 20, 40 µM 1A-116, o vehículo, a diferentes HPS. Se observa una modulación circadiana de los efectos de 1A-116 sobre la proliferación (1A-116 20 µM, Período meta2d: 24 h, $p < 0,001$, 1A-116 40 µM, Período meta2d: ns).

Para estudiar más en detalle la respuesta circadiana a 1A-116, se realizaron curvas de dosis-respuesta para las células LN229 y LN229E1 a 10 HPS y 23 HPS (Figura 7.6 A), los tiempos circadianos de tratamiento con 1A-116 que inducen máxima y mínima inhibición de la proliferación, respectivamente (ver Figura 7.5). En las células LN229, se observó una dependencia significativa del tiempo para 1A-116 10 y 20 µM, observándose efectos mayores en cultivos tratados a 10 HPS. En las

células LN229E1, se encontraron valores de IC50 intermedios en comparación con los observados para LN229 a 10 y 23 HPS, pero sin una dependencia circadiana significativa a 10 y 20 μM . Los efectos inhibitorios de 1A-116 sobre la proliferación alcanzaron la saturación a dosis superiores a 20 μM en todos los grupos, similar a lo obtenido previamente en la figura 6.1. En las células LN229, la IC50 mostró una eficacia del fármaco significativamente mayor a 10 HPS, en comparación con 23 HPS, mientras que esta diferencia no se observó en las células LN229E1. Los valores de IC50 oscilaron entre $10,93 \pm 0,9 \mu\text{M}$ para cultivos de LN229 tratados a 10 HPS y $30,85 \pm 1,78 \mu\text{M}$ para cultivos LN229 tratados a 23 HPS (Figura 7.5 B).

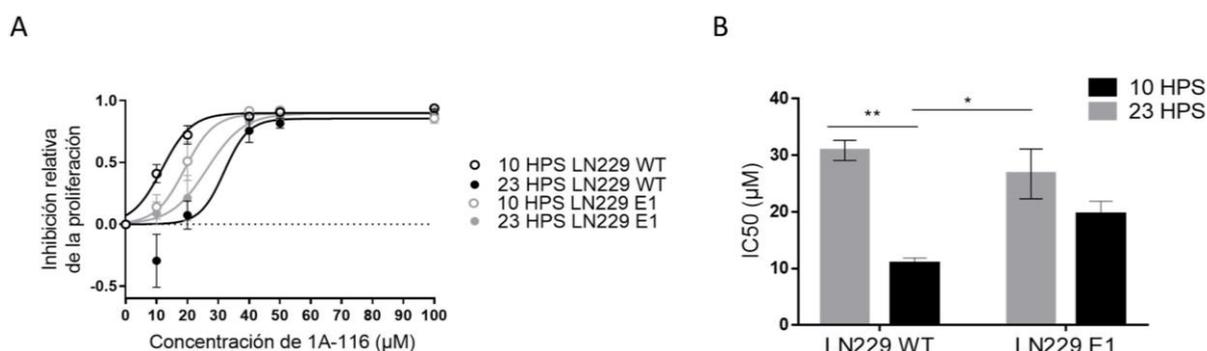


Figura 7.6. Las células LN229 presentan un ritmo de respuesta a 1A-116, el cual se pierde en las células LN229E1, deficientes de *bmal1*. (A) Curvas de dosis-respuesta para la inhibición de la proliferación relativo a las células tratadas con vehículo, en cultivos LN229 y LN229E1 tratados con distintas concentraciones de 1A-116 a 10 HPS o 23 HPS (media \pm EEM). Se observó una respuesta mayor cuando se trató a las células LN229 en 10 HPS (ANOVA de tres vías: HPS, $p < 0,0001$; Concentración de 1A-116, $p < 0,0001$; 1A-116 Concentración \times HPS, $p < 0,001$; HPS \times Tipo celular, $p < 0,005$; 1A-116 Concentración \times HPS \times tipo celular, $p < 0,05$, $N=3$). Solo se indican las principales comparaciones de los resultados obtenidos con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey: LN229 WT 10 HPS 10 μM frente a LN229 WT 23 HPS 10 μM , $p < 0,0001$, LN229 WT 10 HPS 20 μM frente a LN229 WT 23 HPS 20 μM , $p < 0,0003$; LN229 WT 10 HPS 20 μM frente a LN229E1 23 HPS

20 μM , $p < 0,013$, LN229 WT 10 HPS 0 μM frente a LN229 WT 10 HPS 20 μM , $p < 0,0001$, LN229E1 10 HPS 0 μM frente a LN229E1 10 HPS 20 μM , $p < 0,026$). Las curvas de dosis-respuesta se obtuvieron ajustando los valores medios de los datos, que se calcularon a partir de tres experimentos separados. (B) Los valores de IC50 se obtuvieron para experimentos independientes. Se observa que al tratar a las células LN229 con 1A-116 en 10 HPS, los valores de IC50 son significativamente más bajos que al tratarlas en 23 HPS. Estas diferencias desaparecen en las células LN229E1 (ANOVA de dos vías, factor HPS $p < 0,001$, línea celular x HPS, $p < 0,05$. Prueba de Tukey de comparaciones múltiples: 10 HPS LN229 vs. 23 HPS LN229 $**p < 0,01$, 10 HPS LN229 vs. 23 HPS LN229E1, $*p < 0,05$. Media \pm EEM).

4.1.3. La toxicidad de 1A-116 sobre las células LN229 depende del horario de administración

Se procedió a determinar el tiempo mínimo de tratamiento efectivo, es decir, cuánto tiempo deben estar las células en contacto con la droga para obtener una disminución en el número de células significativamente mayor al vehículo, y a su vez, el tiempo necesario para observar diferencias circadianas en la respuesta. Por lo tanto, se planteó un ensayo de toxicidad celular en el que se agregó 1A-116 a cultivos celulares tanto en 10 como en 23 HPS, y se incubó durante 4, 8 o 16 h.

Se evidencia que al tratar a las células con 20, 40 o 100 μM de 1A-116 durante 4h no se observan diferencias significativas con respecto al tratamiento con vehículo (Fig. 7.7 A). Por el contrario, al tratar durante 8 h, si bien no se evidencian diferencias circadianas entre 10 y 23 HPS, se observa que la droga comienza a tener efecto (ANOVA de dos vías, factor droga, $p < 0,05$, Fig 7.7 B). Finalmente, al tratar durante 16 h, se evidencia un efecto de la droga sobre la viabilidad celular, al igual que una diferencia significativa entre horarios, siendo mayor la toxicidad si se trata con 20 o 40 μM de 1A-116 en 10 HPS (ANOVA de dos vías, Factor droga,

$p < 0.05$, Factor horario, $p < 0.05$, Fig 7.7 C). La diferencia circadiana desaparece al tratar con 100 μM , debido a un efecto de saturación, como ya se observó con anterioridad al evaluar la proliferación celular (Fig. 7.6). Por tanto, se observa que la ventana de tratamiento con 1A-116 es de 8 h para evidenciar un efecto sobre la viabilidad celular, y que se necesitan 16 h para observar una diferencia circadiana frente al tratamiento en 10 o 23 HPS. Por otro lado, se evaluaron concentraciones menores de droga (5 y 10 μM), tanto en 4 h, como 8 h y 16 h de tratamiento (Fig. 7.7 D, E y F), para determinar la concentración óptima para los experimentos de migración de manera tal que no haya toxicidad sobre las células. Se evidencia que no hay diferencias significativas con respecto al vehículo para ninguno de los tiempos de tratamiento con estas concentraciones de droga (ANOVA de dos vías, ns).

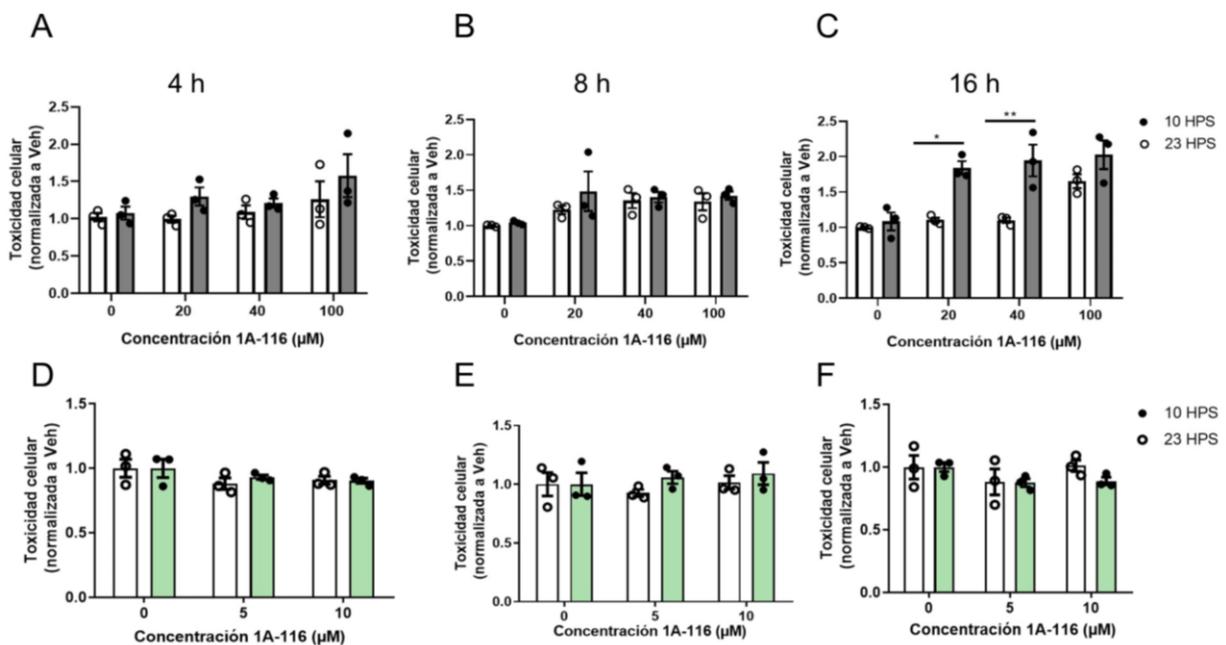


Figura 7.7. La droga 1A-116 presenta una toxicidad mayor a 10 HPS luego de 16 h de tratamiento. Toxicidad de 0, 20, 40 y 100 μM de 1A-116 sobre células LN229 tratadas en 10 y 23 HPS, luego de (A) 4 h de tratamiento (ANOVA de dos vías, ns) (B) 8 h de tratamiento (ANOVA de

dos vías, factor droga, $p < 0.05$) (C) 16 h de tratamiento (ANOVA de dos vías, factor droga: $p < 0.05$. Factor tiempo: $p < 0.05$. Test de comparaciones múltiples de Tukey: 0 μM 23 HPS vs. 100 μM 23 HPS: $p < 0.05$. 0 μM 10 HPS vs 20 μM 10 HPS: $p < 0.05$. 0 μM 10 HPS vs 40 μM 10 HPS: $p < 0.05$. 0 μM 10 HPS vs 100 μM 10 HPS: $p < 0.01$. 20 μM 10 HPS vs 23 HPS: $p < 0.05$. 40 μM 10 HPS vs 23 HPS: $p < 0.01$). Toxicidad de 0, 5, y 10 μM de 1A-116 luego de 4 h de tratamiento (D) (ANOVA de dos vías, ns), 8 h de tratamiento (E) (ANOVA de dos vías, ns), y 16 h de tratamiento (F) (ANOVA de dos vías, ns).

4.1.4. La inhibición de la migración de las células LN229 frente al tratamiento con 1A-116 depende del horario de administración

Para evaluar la dependencia temporal de los efectos de 1A-116 sobre la migración celular, se procedió a medir la invasión de un área libre de células en cultivos tratados con 1A-116, o vehículo, a 10 HPS y 23 HPS (Figura 7.8).

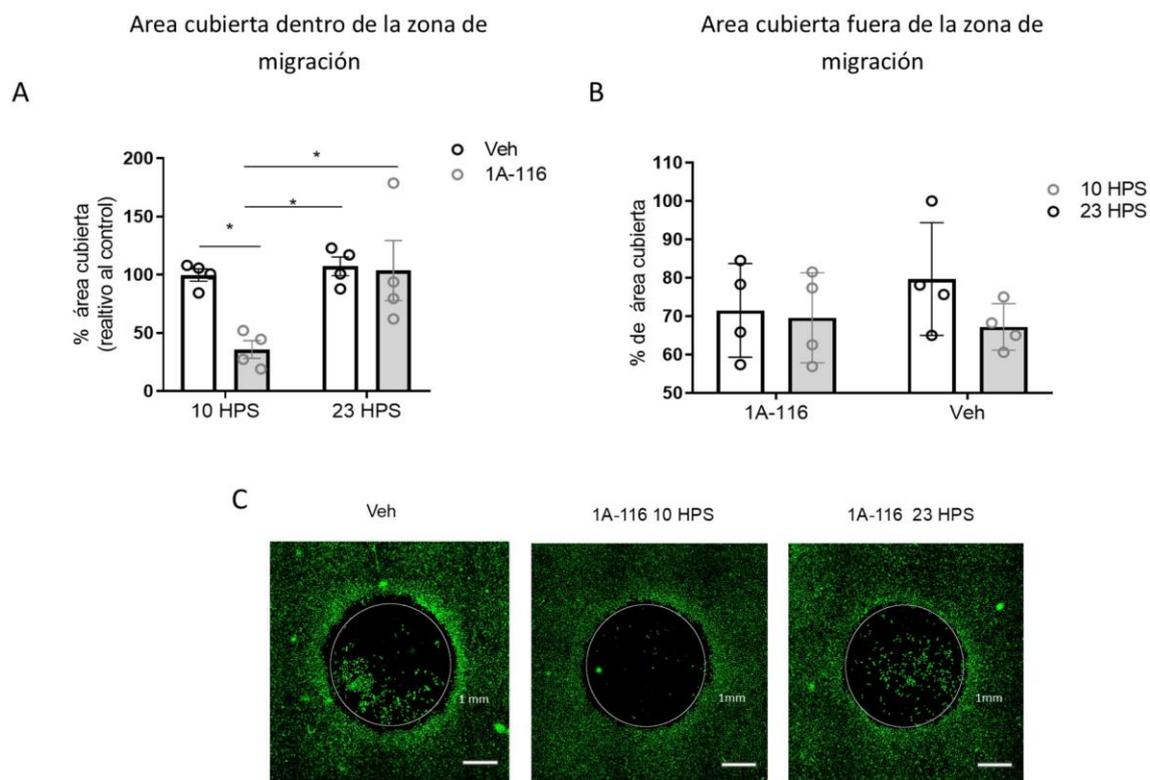


Figura 7.8. La migración celular es menor cuando el tratamiento con 1A-116 se realiza a las 10 HPS. La migración celular hacia un área libre de células se midió en cultivos tratados con 1A-116 (10 μM) o vehículo a 10 HPS o 23 HPS. 16 h después del tratamiento, las células vivas se tiñeron con Calceína AM, obteniendo imágenes con el equipo Cytation 5 (canal de GFP) para cuantificar la intensidad de fluorescencia con el software ImageJ. El área cubierta por células se midió normalizando al área cubierta del vehículo (control), después de restar de los datos los controles técnicos (t_0) y relativizar al área por fuera del área libre de células. (A) El área cubierta para las células tratadas con 1A-116 10 μM a 10 HPS se redujo significativamente, pero no así a 23 HPS (ANOVA de dos vías, factor HPS $p < 0,05$, factor concentración, $p < 0,05$. Prueba de comparaciones múltiples de Sidak: 1A-116 10 HPS vs 23 HPS: $*p < 0,05$; 10 HPS Veh vs 1A-116: $*p < 0,05$, 10 HPS 1A-116 vs 23 HPS Veh: $p < 0,05$, $N=4$). (B) Porcentaje de área cubierta con células por fuera del área de migración (área libre de células generada por el tapón) (ANOVA de dos vías, ns. $n=4$). (C) Imágenes representativas del área de migración a las 16 h después del tratamiento. La barra de

escala representa 1 mm y los círculos blancos representan el área originalmente libre de células donde se cuantificó la migración celular.

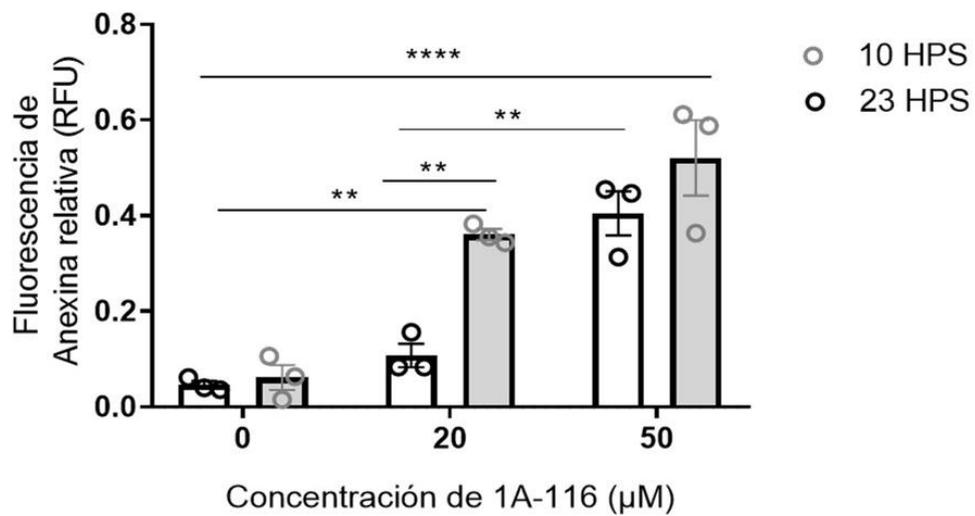
Para estos ensayos se seleccionó la concentración 10 μM de 1A-116 ya que no muestra efectos sobre la viabilidad celular a las 16 h (Figura 7.7 E). La adición de 1A-116 10 μM a 10 HPS redujo significativamente la migración celular, en comparación con cultivos tratados a 23 HPS con la misma concentración de 1A-116 o con cultivos tratados con vehículo, evidenciando una dependencia temporal de los efectos de 1A-116 sobre este proceso (Figura 7.8 A). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el número de células fuera del área libre de células, las cuales se cuantificaron para normalizar los datos de migración (considerando posibles diferencias en el número de células disponibles para migrar) (Figura 7.8 B). La figura 7.8 C muestra imágenes representativas del área libre de células y de la migración celular, tanto para vehículo como para 10 μM 1A-116 en 10 y 23 HPS.

4.1.5. La inducción de apoptosis en las células LN229 frente al tratamiento con 1A-116 depende del horario de administración

Cardama *et al.* (2014) han descrito que 1A-116 induce apoptosis, por lo tanto, se evaluó si este proceso depende del horario de tratamiento, tratando a las células LN229 con 20 o 50 μM de 1A-116 durante 6 h (Figura 7.9). Al aplicar 1A-116 20 μM a 10 HPS o 23 HPS, se observó una diferencia significativa en la señal de fluorescencia de anexina V, con niveles más altos detectados a 10 HPS, lo que indica que más células se encuentran en apoptosis en los cultivos tratados a 10 HPS. A 50 μM , la inducción de apoptosis por 1A-116 no mostró diferencias

significativas al comparar los cultivos tratados a 10 HPS con aquellos tratados a 23 HPS. Similar a los resultados obtenidos para los ensayos de proliferación, la actividad pro-apoptótica de 20 μM 1A-116 fue más efectiva cuando se aplicó a 10 HPS que a 23 HPS (Figura 7.8 A). La figura 6.8 B muestra imágenes representativas de la apoptosis de las células LN229 en ambos horarios.

A



B

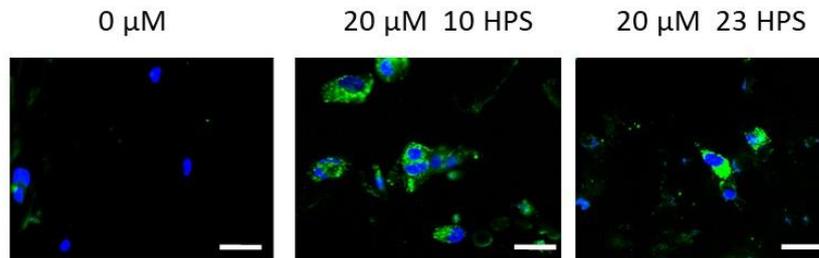


Figura 7.9. La inducción de apoptosis de 1A-116 es mayor a 10 HPS en células LN229. La tinción con anexina V se usó para medir la apoptosis temprana en cultivos de LN229 6 h después de la adición del vehículo, 20 μM o 50 μM de 1A-116. La intensidad de la fluorescencia se midió en un sistema Cytation 5 y se usó tinción DAPI para relativizar el número de células apoptóticas respecto

al total. (A) Se obtuvieron valores relativos de apoptosis temprana para tres experimentos independientes ($n=3$), y se compararon entre tratamientos a 10 HPS y 23 HPS. Se observaron valores significativamente mayores cuando el tratamiento se aplicó a 10 HPS (ANOVA de dos vías, factor HPS, $p<0,01$, factor Concentración, $p<0,001$, interacción, $p<0,05$. Comparaciones múltiples de Tukey: $0\ \mu\text{M}\ 23\ \text{HPS}$ vs $20\ \mu\text{M}\ 10\ \text{HPS}$: $**p<0,01$, $0\ \mu\text{M}\ 10\ \text{HPS}$ vs $20\ \mu\text{M}\ 10\ \text{HPS}$: $**p<0,01$, $0\ \mu\text{M}\ 23\ \text{HPS}$ vs $50\ \mu\text{M}\ 23\ \text{HPS}$: $***p<0,001$, $0\ \mu\text{M}\ 10\ \text{HPS}$ vs $50\ \mu\text{M}\ 10\ \text{HPS}$: $****p<0,0001$, $0\ \mu\text{M}\ 23\ \text{HPS}$ vs $50\ \mu\text{M}\ 10\ \text{HPS}$: $***p<0,0001$, $20\ \mu\text{M}\ 23\ \text{HPS}$ vs $20\ \mu\text{M}\ 10\ \text{HPS}$: $**p<0,01$, $20\ \mu\text{M}\ 23\ \text{HPS}$ vs $50\ \mu\text{M}\ 23\ \text{HPS}$: $**p<0,01$). (B) Imágenes representativas obtenidas para confirmar cualitativamente los resultados de tinción en células LN229 a 10 HPS y 23 HPS, 6 h después del tratamiento con 1A-116. Las barras de escala blancas representan $20\ \mu\text{m}$.

4.1.6. La efectividad de 1A-116 es cronomodulada *in vivo*.

Los resultados obtenidos *in vitro* demuestran que la efectividad de 1A-116 está modulada por un oscilador circadiano presente en las células LN229. Por lo tanto, se procedió a realizar pruebas en un modelo murino de GBM, de manera tal de demostrar si existe un efecto cronomodulado *in vivo* de la administración del fármaco 1A-116. Para ello, se implantaron células LN229 en el cerebro de ratones *nude*, y se trató a los mismos con la droga en dos momentos diferentes del día, a ZT3 y ZT12, es decir, 3 horas después de encender las luces y en el momento del apagado, respectivamente. Dichos horarios son cercanos al pico y al valle de *bmal1* en estas células *in vivo* (ver Capítulo I), de manera de garantizar que la droga sea administrada en dos momentos lo suficientemente separados tanto a nivel circadiano como fisiológico. Se observó un aumento significativo en el tiempo de supervivencia cuando se administró 1A-116 en ZT12 en comparación con el mismo tratamiento en ZT3 y con vehículo. La mediana de supervivencia obtenida fue de 73 días para 1A-116 en ZT12, 68 días para ZT3, 64.5 días para el vehículo en ZT12 y

63.5 días para el vehículo en ZT3 (prueba de rango logarítmico de Mantel-Cox, $p < 0,05$) (Figura 7.10 A), lo que demuestra que la eficacia de 1A-116 se puede mejorar seleccionando la hora del día de administración. Cuando se evaluaron los pesos de los diversos grupos, no se evidenciaron diferencias significativas, pese a que se observa una tendencia de los ratones tratados en ZT12 a no perder peso (Figura 7.10 B, Test de Kruskal-Wallis, ns). Estos resultados sugieren que una terapia cronomodulada con 1A-116 es una estrategia viable para mejorar la sobrevida ante un GBM.

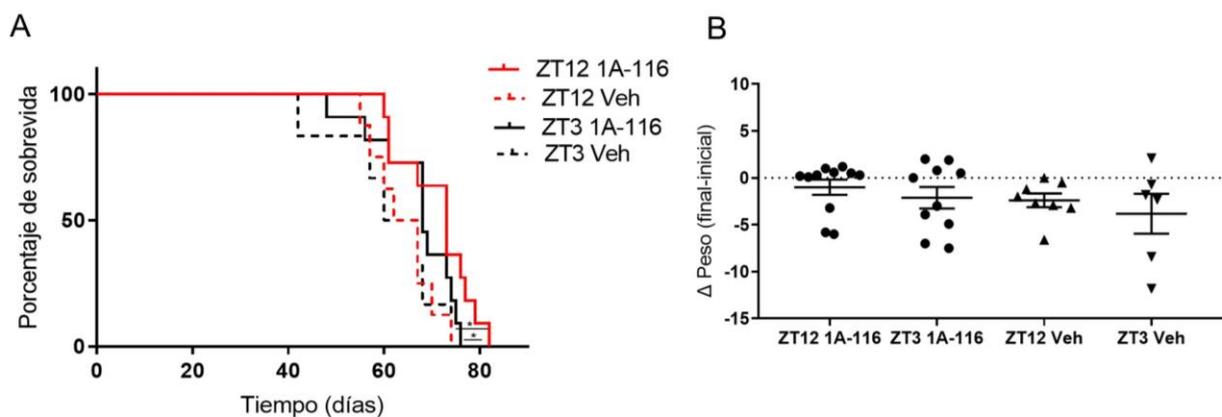


Figura 7.10. Los ratones *nude* implantados con GBM tratados con 1A-116 en ZT12 poseen mayor sobrevida que los ratones tratados con 1A-116 en ZT3. (A) Las curvas de supervivencia de ratones *nude* tratados con vehículo o 1A-116 en ZT3 y ZT12 fueron significativamente diferentes ($n=11$, prueba de rango logarítmico de Mantel-Cox, $p < 0,05$). La mediana de supervivencia aumentó en ZT12. Se enumeran los tiempos medios de supervivencia obtenidos del ajuste de los datos: ZT12 Veh: 64,5 días, ZT3 Veh: 63,5, ZT12 1A-116: 73 días, ZT3 1A-116: 68 días. (B) variación del peso (peso final menos inicial) de los ratones de los 4 grupos experimentales ($n=10$, Test de Kruskal-Wallis, ns).

4.2. Cronofarmacología de la droga TMZ.

4.2.1. TMZ presenta un ritmo de efectividad en las células LN229

Si bien ya se ha demostrado que la droga TMZ puede ser aplicada con un enfoque cronofarmacológico en humanos (ver la “Introducción” del Capítulo III), la finalidad de los experimentos del presente apartado fue continuar describiendo la cronofarmacología de la droga TMZ en modelos murinos, para analizar si es posible mejorar aún más su administración, variando la concentración de la droga, mejorando su efectividad y disminuyendo su toxicidad. Por otro lado, siendo que TMZ es la droga que actualmente se utiliza para el tratamiento quimioterápico del GBM, los experimentos realizados sirven para ser comparados con los datos obtenidos para la droga novedosa 1A-116, y pensar estrategias futuras de aplicación conjunta. Por lo tanto, se procedió a tratar a las células LN229 con distintas concentraciones de TMZ en distintos HPS, de forma tal de determinar si existe una respuesta cronomodulada a la droga, para luego proceder con los experimentos *in vivo*. Cabe aclarar que la IC₅₀ de TMZ ya ha sido determinada y corresponde a 200 μM para las células LN229 (Damato, sin publicar). Teniendo en cuenta estos resultados previos, se seleccionaron concentraciones superiores e inferiores al IC₅₀, siendo las mismas 1, 10, 50, 100, 200 y 1000 μM (Figura 7.11). Se observa que las concentraciones 1 y 10 μM no presentan efecto sobre la proliferación de las células LN229. Sin embargo, ya a partir de 50 μM comienza a evidenciarse su efecto inhibitorio, el cual presenta una diferencia circadiana cuando se trata a las células con 100 μM , siendo máximo para 20 HPS (en coincidencia con el pico de *bmal1* en estas células) (Figura 7.11 A, ANOVA de dos vías, factor tiempo $p < 0.05$, factor concentración $p < 0.001$, test de comparaciones múltiples de Tukey, 100 μM , 12 vs 20 HPS, $p < 0.05$). Tanto para 200 como para 1000 μM , no se

evidencian diferencias circadianas en el tratamiento, obteniéndose también inhibiciones máximas de la proliferación celular. Para facilitar la visualización de los resultados, las figuras 7.10 B, C y D muestran el tratamiento con 10 μM (concentración sin efecto sobre la proliferación), 100 μM (concentración con efecto circadiano), y 200 μM (IC_{50} y concentración superior sin efecto circadiano), comparado con 1000 μM (máxima concentración, valores cercanos a la máxima inhibición de la proliferación de LN229 en todos los HPS).

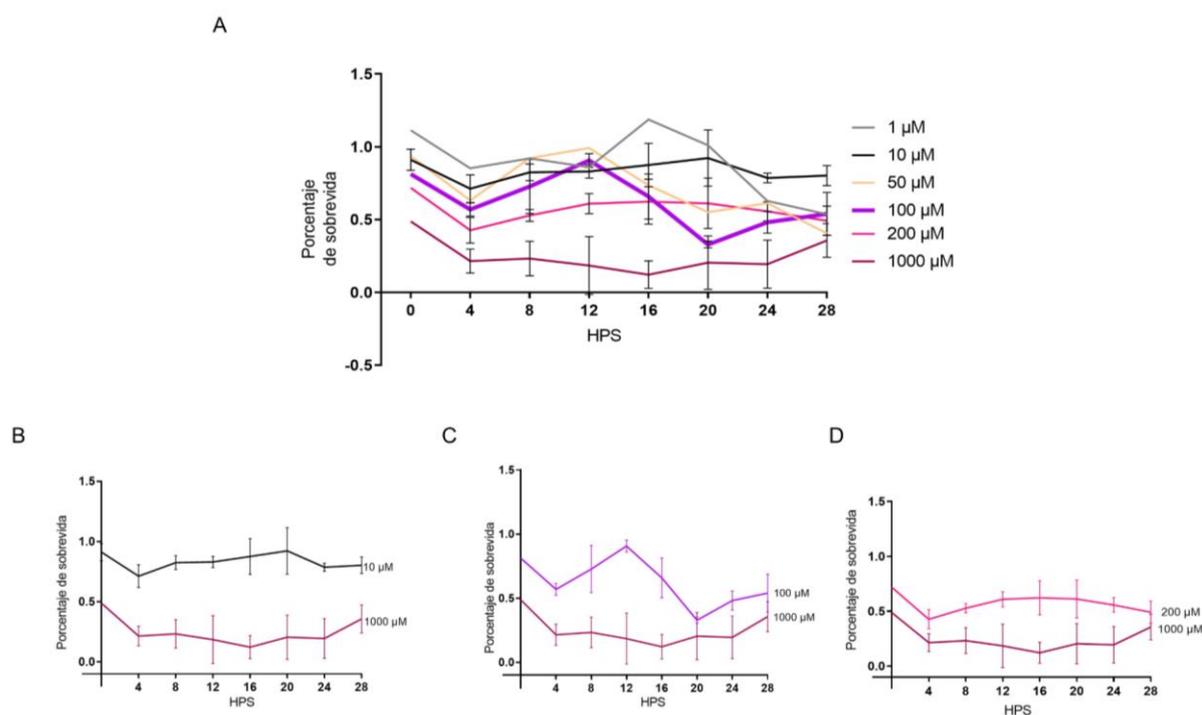


Figura 7.11. TMZ muestra una respuesta circadiana en células LN229. (A) Células LN229 tratadas con 1,10, 50, 100, 200 y 1000 μM o DMSO 0.2% (vehículo) en distintos HPS. Los resultados se encuentran expresados relativos al vehículo para cada HPS, y expresados de forma porcentual (porcentaje de supervivencia) (ANOVA de dos vías, factor tiempo $p < 0.05$, factor concentración $p < 0.001$. Test de comparaciones múltiples de Tukey: 100 μM , 12 vs 20 HPS, $p < 0.05$. $n = 3$, Media \pm EEM). Para mejorar la visualización de los resultados, se muestran las células tratadas con (B) 10 μM (C) 100 μM o (D) 200 μM , con respecto a 1000 μM .

4.2.2. TMZ no presenta una efectividad dependiente del momento de administración *in vivo*

Para evaluar la variación diaria en la eficacia del tratamiento con TMZ *in vivo*, se implantaron ratones *nude* con células LN229 que contenían el plásmido Bmal1-luc, se los trató con la droga o vehículo en ZT1 o ZT11, y se evaluó el crecimiento del tumor cada dos a tres días para monitorear la respuesta. Dichos horarios son cercanos al pico y al valle de *bmal1* en estas células *in vivo* (ver Capítulo I), de manera de garantizar que la droga sea administrada en dos momentos lo suficientemente separados a nivel cronofisiológico.

Se evidencia que, si bien el tratamiento de TMZ genera una mayor sobrevida que al tratar a los animales con vehículo (Mediana de sobrevida TMZ ZT1: 50 días, Mediana de sobrevida TMZ ZT11: 46 días, Mediana de sobrevida DMSO ZT1: 44 días, Mediana de sobrevida DMSO ZT11: 40 días), no se encontraron diferencias significativas al tratar con TMZ a ZT1 o ZT11 (Figura 7.12 A, prueba de rango logarítmico de Mantel-Cox, ns). A su vez, tampoco se evidenciaron diferencias significativas al analizar el peso de los animales a lo largo del protocolo (Figura 7.12 B, ANOVA de una vía, ns), ni diferencias entre machos y hembras (Figura 6.11 A).

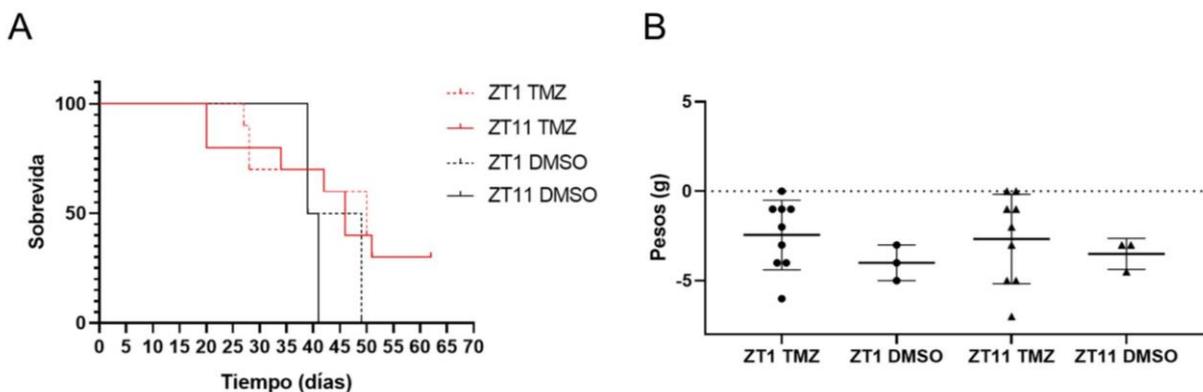


Figura 7.12. La efectividad de TMZ no presenta diferencias circadianas en ratones *nude* cuando se aplica en ZT1 o ZT11. (A) Se evidencia que los ratones tratados con vehículo poseen

una menor mediana de supervida al comparar con los tratados con TMZ. Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre las curvas al tratar a los ratones con TMZ en ZT1 o ZT11. Tampoco se evidenciaron diferencias significativas entre machos y hembras, por lo que los datos se muestran conjuntamente (N=9. Prueba de rango logarítmico de Mantel-Cox, ns. Mediana supervida TMZ ZT1: 50, Mediana de supervida ZT11: 46, Mediana de supervida DMSO ZT1: 44, Mediana de supervida DMSO, ZT11: 40).

Posteriormente, se analizó la progresión tumoral a través de bioluminiscencia *in vivo*, cada dos a tres días, en busca de posibles diferencias entre los ratones tratados con TMZ a ZT1 o ZT11. No se vieron diferencias significativas en la bioluminiscencia, indicativa de progresión tumoral, a lo largo del protocolo (Figura 7.13 A). Se evidencia que la bioluminiscencia aumenta, y una vez que se comienza con el tratamiento en el día 12, la misma disminuye hasta llegar a niveles similares a los de pretratamiento en el día 25 (Figura 7.13 B). Finalmente, se analizó el área tumoral mediante marcación con ki67, sin evidenciarse diferencias significativas entre ambos tratamientos, pero observándose que el tamaño tumoral es mayor cuando los animales son tratados con vehículo (Figura 7.13 C y D).

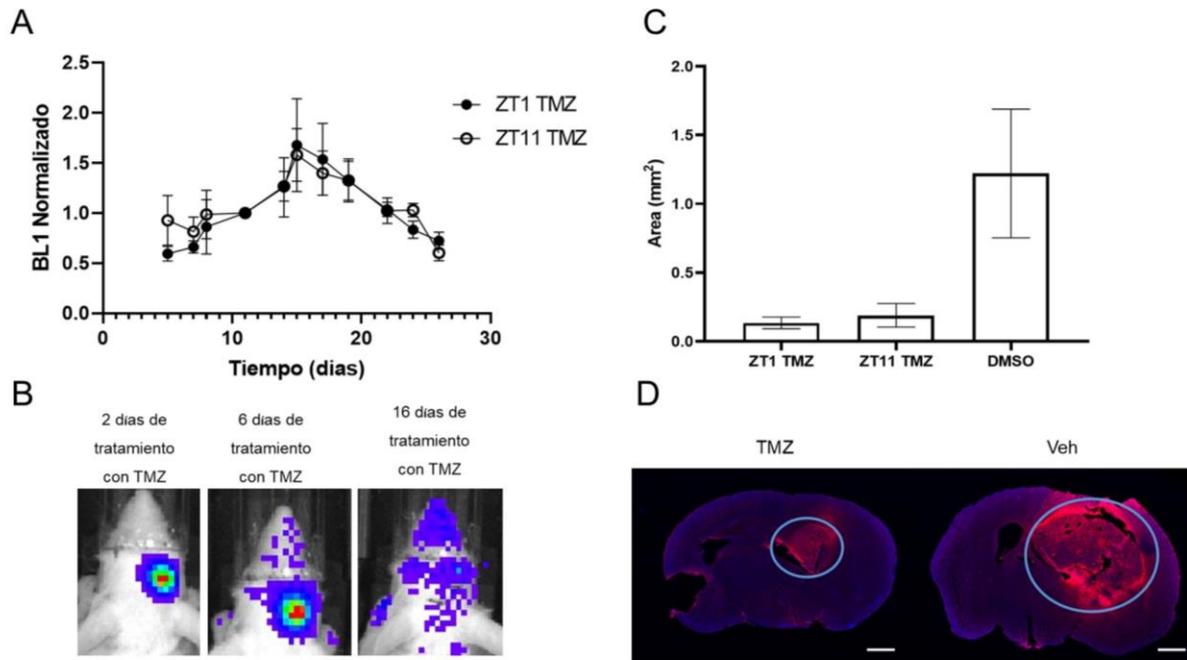


Figura 7.13. Los animales tratados con TMZ en distintos horarios no presentan diferencias en la progresión tumoral. (A) Bioluminiscencia de *bmal1* en el tumor normalizada al día previo al inicio de tratamiento (día 11) para los ratones tratados con TMZ en ZT1 y ZT11 (N=6, ANOVA de dos vías, factor tiempo: $p < 0.05$. Factor tratamiento: ns. Media \pm EEM). (B) Imágenes representativas de bioluminiscencia para 2, 6 y 16 días después del tratamiento con TMZ. (C) Área tumoral (en mm²) para los ratones tratados con TMZ en ZT1 y ZT11, y tratados con vehículo (DMSO, ambos horarios se muestran conjuntamente) (N=5. Test de Kruskal-Wallis, $p < 0.05$. Test de Dunn: DMSO vs TMZ ZT1: ns, DMSO vs TMZ ZT11: ns, TMZ ZT11 vs ZT1: ns. Media \pm EEM). (D) Imágenes representativas de microscopía 2,5 x de tumores teñidos con ki67, tratados con TMZ o vehículo. El área tumoral se muestra con un círculo azul. La línea blanca indica 1 mm.

5. Discusión

En el presente capítulo se evidenció una modulación circadiana de los efectos de 1A-116 tanto en las células LN229 de GBM *in vitro*, como en ratones *nude* desarrollando GBMs originados por implantes ortotópicos de LN229. A su vez, mientras que el ARNm de Rac1 no mostró oscilaciones circadianas, el GEF TIAM1 (blanco de la droga) presentó ritmos circadianos tanto en la expresión de ARNm como a nivel de proteína (Figura 7.1 y Figura 7.2), en antifase con BMAL1 (ver Capítulo I).

Al exponer las células a 10 y 20 μM de 1A-116, la proliferación se inhibió cuando el fármaco se aplicó a 10 HPS, pero no a 23 HPS, mientras que no se observó dependencia circadiana en concentraciones más altas, observándose un efecto de saturación (Figura 7.4 y 7.5). En consecuencia, se observó una reducción de la IC50 cuando los cultivos se trataron con 1A-116 a 10 HPS en comparación con 23 HPS. Esta diferencia desapareció en las células LN229E1, que carecen de ritmos circadianos de expresión de BMAL1, TIAM1 y PER1, lo que sugiere que la eficacia del fármaco está regulada por el reloj molecular circadiano. Cuando se aplicó cerca del momento del pico de expresión de TIAM1, las concentraciones bajas de 1A-116 (20 μM) provocaron efectos similares en las células LN229 a los obtenidos en otros puntos temporales con concentraciones de saturación.

Todos los otros efectos antitumorales estudiados del fármaco, entre los que se encuentran la toxicidad (Figura 7.6), la inhibición de la migración (Figura 7.7) y la inducción de la apoptosis (Figura 7.8) se encontraron en fase con el nivel máximo de expresión de TIAM1, y el mínimo de BMAL1, es decir, fueron máximos a 10 HPS. Por otro lado, al tratar a ratones *nude* con la droga en dos horarios diferentes, se observó una mayor sobrevida cuando el tratamiento se realiza en ZT12, al principio

de la fase de actividad (Figura 7.9), y coincidentemente con los resultados obtenidos *in vitro*, el momento del mínimo de expresión de BMAL1 (ver Capítulo I). Por lo tanto, estos resultados muestran que los efectos de 1A-116 pueden ser cronomodulados tanto *in vitro* como *in vivo*.

Hay vasta evidencia que relaciona al sistema circadiano con el riesgo y la progresión del cáncer (Benna *et al.*, 2017). Ya se han informado alteraciones del ritmo circadiano celular en diferentes modelos de cáncer (Religio *et al.*, 2014) al igual que se ha establecido una conexión entre la progresión del glioma y el reloj circadiano (Madden *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2019). Se descubrió que dos genes que desempeñan funciones importantes en la regulación del reloj circadiano, la caseína quinasa-1 épsilon (CK-1 ϵ) y el receptor nuclear NR1D2, regulan la supervivencia de las células GBM y se propusieron como blancos para el tratamiento del glioma (Varghese *et al.*, 2018). Además, la vía de P38 MAPK, vinculada a la sincronización circadiana fótica (Hainich *et al.*, 2006), fue propuesta como un buen blanco para tratar diferentes tipos de cáncer incluyendo al GBM, y se encontró que estaba bajo control circadiano en astrocitos normales, pero desregulada en células de GBM (Goldsmith *et al.*, 2018). En ese sentido, existen entonces diversas vías de señalización celular implicadas en la proliferación y la progresión tumoral, y que a su vez se encuentran vinculadas al reloj circadiano. Dichas vías son blancos interesantes a la hora de pensar en estrategias cronoterapéuticas. En el contexto de este trabajo, lo que hace que la vía de RAC1 sea un objetivo interesante desde una perspectiva cronofarmacológica, es que está relacionada con la mayoría de las vías que vinculan al GBM con el reloj circadiano: por un lado, se descubrió que una caída de NR1D2 altera la fosforilación de Rac1 (Yu *et al.*, 2018) , por otro, se sabe que la vía de p38 MAPK es activada por RAC1

(Mainiero *et al.*, 2000; Flevaris *et al.*, 2009), y finalmente, ha sido demostrado que los mutantes de CK-1 ϵ en el cáncer de mama activan la vía no canónica Wnt/Rac-1/JNK que contribuye al desarrollo del cáncer (Foldynová-Trantírková *et al.*, 2010). Sin embargo, solo dos trabajos han analizado hasta el momento la oscilación circadiana del ARNm de Rac1 en células de médula espinal de ratón (Luo *et al.*, 2009) y de melanoma (Lee *et al.*, 2021), encontrando una ausencia de oscilación circadiana, similares a los resultados obtenidos en este capítulo. Por otro lado, no había sido descrita hasta el momento la oscilación circadiana del GEF TIAM1, el cual es fundamental en la activación de la vía de Rac1. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este capítulo no solo colaboran en comprender en mayor profundidad la dinámica cronofarmacológica de 1A-116, sino que colaboran en entender la vía de Rac1 desde un enfoque circadiano, lo cual puede servir para pensar en nuevos tratamientos para distintos tipos de cáncer (además del GBM). Es necesario seguir realizando experimentos en pos de analizar los mecanismos y las implicaciones que vinculan al reloj molecular circadiano con toda la vía de Rac1, determinando los mecanismos subyacentes al control circadiano de TIAM1 y de otros posibles GEFs. Dado que se evidenció que TIAM1 y BMAL1 se encuentran en antifase, una posible hipótesis es que la regulación no se esté llevando a cabo mediante la unión de BMAL1 a E-boxes en el promotor de TIAM1, sino que esté ocurriendo a través de otro de los mecanismos de regulación circadiana ya descritos, como D-boxes, RREs, o elementos de respuesta del tipo cAMP (CREs) (Ueda *et al.*, 2005). Por ejemplo, se ha demostrado que proteínas controladas por el reloj pueden actuar a su vez como activadores de otros genes de forma circadiana, como la proteína STAT3 (Bozek *et al.*, 2009), la cual está íntimamente relacionada con la vía de Rac1 (Simon *et al.*, 2000).

Adoptar un enfoque cronofarmacológico en un tratamiento dado implica encontrar el momento óptimo para la aplicación del fármaco. Definir un momento óptimo no es trivial, ya que depende de una gran cantidad de procesos que deben tenerse en cuenta, incluidos los efectos secundarios y deseados, los costos, la viabilidad, la tolerancia, la farmacodinámica y la farmacocinética (Dallman *et al.*, 2013). Sin embargo, en la mayoría de los casos, el momento óptimo para el tratamiento será el que genere el máximo índice terapéutico y la mayor relación entre los efectos deseados y los secundarios (Ruben *et al.*, 2019). La cronoterapéutica de los fármacos antitumorales se probó en una amplia variedad de cánceres, encontrando que el momento de la administración puede generar diferencias significativas en la supervivencia y el crecimiento tumoral (Focan, 1987). Levi *et al.* (1997) demostraron que la administración de oxaliplatino con un esquema cronofarmacológico en pacientes con cáncer colorrectal reduce su toxicidad sobre las células normales. Para GBM, se informó que los efectos de TMZ y VX-745 (un inhibidor de p38 MAPK) dependen del momento de la administración *in vitro* (Goldsmith *et al.*, 2018; Slat *et al.*, 2017). En nuestro modelo, se observó una mayor eficacia de 1A-116 en tiempos circadianos de baja expresión de BMAL1 en células LN229 de GBM, y se encontró una supervivencia general diferencial al aplicar 1A-116 en ZT12 a ratones *nude* desarrollando GBMs originados por implantes ortotópicos de LN229.

Por otro lado, al llevar a cabo estudios con la droga actual de tratamiento, TMZ, se evidenciaron diferencias circadianas en su efectividad sobre las células LN229, obteniéndose una mayor inhibición de la proliferación en el momento en que la expresión de *bmal1* es máxima (Figura 7.10), siendo estos resultados similares a los encontrados por Slat *et al.* (2017). A su vez, es importante destacar que la

máxima efectividad de la droga se condice con el momento de menor expresión de *mgmt* (Gonzalez-Aponte y Damato, en revisión), estableciéndose una relación crono farmacodinámica entre el efecto de la droga y la expresión de la enzima que colabora en conferir resistencia a la misma.

Sin embargo, cuando se llevaron a cabo los estudios *in vivo* en ratones, no se observó una diferencia en la sobrevida al ser tratados con TMZ a ZT1 o a ZT11 (Figura 7.11). A su vez, se evidencia que al tratar con TMZ, el tamaño tumoral se reduce considerablemente, llegando casi a niveles basales, lo cual genera que muchos ratones no alcancen el punto final (Figura 7.12). Esto indica que el comportamiento que posee la TMZ en ratones *nude* no permite modelar correctamente lo que ocurre en humanos, y que tampoco se evidencian los efectos cronofarmacológicos obtenidos en pacientes (Damato *et al.*, 2021; Damato *et al.*, 2022). Sin embargo, es importante destacar que en colaboración con el laboratorio del Dr. Erik Herzog se continuaron estos estudios, analizando una dosis mayor de TMZ (100 mg/kg), administrando la droga en el máximo de *bmal1* (ZT4) y en ZT11, y disminuyendo el tiempo de tratamiento tan solo una semana. Variando estas condiciones, se obtuvo como resultado que la TMZ administrada en ZT4 genera una mayor sobrevida en los ratones *nude* (Gonzalez-Aponte y Damato, en revisión). Estos resultados muestran claramente la complejidad de la cronofarmacología, la cual depende de la concentración de la droga administrada, el horario en el cual la droga se administra, las toxicidades asociadas, entre otros factores. Finalmente, sería interesante llevar a cabo estudios de cronotoxicidad con TMZ en modelos murinos, para analizar si hay algún horario donde la droga presenta mayores efectos secundarios, similar a lo que ocurre en humanos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente capítulo, se concluye que una aplicación cronomodulada con 1A-116 es una estrategia factible para mejorar la supervivencia del GBM. Es necesario realizar más estudios para identificar los mecanismos farmacológicos subyacentes a la dependencia del tiempo *in vivo* del tratamiento con 1A-116, así como para encontrar el tiempo de tratamiento óptimo. Debido al conocimiento muy limitado sobre la cronofarmacocinética de 1A-116, no es posible predecir cuál será el momento óptimo para el tratamiento en ensayos clínicos. Sin embargo, nuestros resultados proporcionan un buen punto de partida para empezar a pensar en esta alternativa.

A su vez, es posible pensar en una estrategia conjunta que incluya a 1A-116 y TMZ. Actualmente, muchas nuevas drogas oncológicas se aplican combinadas con el tratamiento utilizado hasta ese momento. Si se logra encontrar las dosis en que actúan de forma sinérgica en vez de actuar de forma antagónica, esto permitiría maximizar los efectos de ambas drogas, logrando así mayor eficiencia (Heske *et al.*, 2017; Ferguson *et al.*, 2017). Si bien deben llevarse a cabo análisis estadísticos muy específicos para determinar interacciones sinérgicas, es posible definir dos conceptos fundamentales a tener en cuenta: la vía de acción de cada droga, y las concentraciones requeridas para observar un efecto sinérgico (Greco *et al.*, 1995). Como ya fue mencionado, 1A-116 es un inhibidor específico de Rac1, mientras que TMZ metila el ADN de células en proliferación. Debe realizarse un análisis molecular más profundo de las vías de señalización para determinar en qué punto se encuentran interactuando dichas drogas, y tener en cuenta también que las máximas efectividades *in vitro* fueron encontradas en antifase para ambas drogas, ya que TMZ mostró su efecto máximo sobre la proliferación de LN229 en el pico de *bmal1*, mientras que 1A-116 lo mostró en el valle.

La diferencia circadiana de la efectividad de 1A-116 *in vivo* puede ser la consecuencia de una variedad de factores cronofarmacocinéticos y cronofarmacodinámicos, incluyendo el control circadiano del transporte de 1A-116 en las células y/o en la barrera hematoencefálica, la oscilación circadiana en la expresión de TIAM1, la modulación de los componentes río arriba y abajo de las vías afectadas, entre otros. Anteriormente se demostró que los ritmos circadianos de los procesos farmacocinéticos desempeñan un papel importante en las variaciones temporales de la eficacia de varios fármacos (Cobuchi *et al.*, 2018; Sallam *et al.*, 2015). Por lo tanto, los estudios futuros que involucren a 1A-116 deben considerar un enfoque cronofarmacológico, abordando tanto la cronofarmacodinámica (es decir, la interacción circadiana con TIAM1) como la cronofarmacocinética, para revelar completamente los mecanismos subyacentes a la modulación de su actividad.

El momento correcto de la dosis del fármaco ha sido un factor en gran medida subestimado en los esquemas terapéuticos establecidos para la mayoría de las enfermedades (Zhang *et al.*, 2014). Esto se vuelve particularmente importante en el tratamiento del cáncer, donde la ventana terapéutica de la mayoría de los medicamentos es generalmente estrecha y existe la necesidad de optimizar los resultados terapéuticos minimizando los efectos secundarios asociados (Muller y Milton, 2012). Este capítulo destaca la oportunidad de explotar un enfoque cronoterapéutico con un agente que bloquea la interacción de Rac1 con sus GEFs, proporcionando resultados prometedores para abordar el glioblastoma, un cáncer agresivo, y con opciones terapéuticas extremadamente limitadas. Es necesario seguir estudiando nuevos fármacos y esquemas de tratamiento que puedan prolongar la esperanza de vida y la supervivencia global de los pacientes,

idealmente con menos efectos colaterales o efectos más leves. En este sentido, nuestros resultados indican que 1A-116 muestra potencial como nuevo fármaco para el tratamiento cronomodulado del GBM.

6. Resumen del Capítulo

En el presente capítulo, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Se observa que TIAM1, tanto a nivel del ARNm como proteína, presenta una oscilación circadiana en las células LN229, la cual se pierde en las células LN229E1.
- La droga 1A-116 presenta una efectividad diferencial dependiendo del HPS de administración, tanto sobre la proliferación, como la migración, toxicidad y apoptosis en las células LN229.
- La droga 1A-116 puede ser aplicada con un enfoque cronofarmacológico en ratones *nude*, obteniéndose mayor sobrevida en ZT12.
- La droga TMZ presenta una efectividad diferencial dependiendo del HPS sobre la proliferación de las células LN229.
- Al aplicar la droga TMZ en ZT4 y ZT11 con una concentración de 70 mg/kg, no se observan diferencias en la sobrevida de ratones *nude*.

Bibliografía del Capítulo III

Agostino, P.G. y Golombek, D, (2002) 'Characterization of Proteases in the Hamster Suprachiasmatic Nucleus'. *Biological Rythm Research*. 33(4)

Benna C, *et al.* (2017) 'Genetic variation of clock genes and cancer risk: a field synopsis and meta-analysis'. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.15074.

Bode-Böger SM, Kojda G.(2005) 'Organic nitrates in cardiovascular disease'. *Cellular and Molecular Biology*.

Bouchahda M, *et al.* (2023). 'Multicentre, interventional, single-arm study protocol of telemonitored circadian rhythms and patient-reported outcomes for improving mFOLFIRINOX safety in patients with pancreatic cancer (MultiDom, NCT04263948)'. *BMJ Open*. 13(6):e069973. doi: 10.1136/bmjopen-2022-069973.

Bozek K, *et al.* (2009) 'Regulation of clock-controlled genes in mammals'. *PLoS One*. 4(3):e4882. doi: 10.1371/journal.pone.0004882.

Cardama, G.A., *et al.* (2014) 'Proapoptotic and antiinvasive activity of Rac1 small molecule inhibitors on malignant glioma cells'. *Onco Targets Ther*, 7: p. 2021-33.

Ciarlantini MS, *et al.* (2021). 'Development of an Improved Guanidine-Based Rac1 Inhibitor with in vivo Activity against Non-Small Cell Lung Cancer'. *ChemMedChem*. 16(6):1011-1021. doi: 10.1002/cmdc.202000763.

Dallmann, R., S.A. Brown, and F. Gachon, (2014). Chronopharmacology: new insights and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 54: p. 339-61.

Damato A.R., *et al.* (2021) 'Temozolomide chronotherapy in patients with glioblastoma: a retrospective single-institute study'. *Neurooncol Adv.* 3(1):vdab041

Damato A.R., *et al.* (2022) 'A randomized feasibility study evaluating temozolomide circadian medicine in patients with glioma'. *Neurooncol Pract.* 9(3):193–200.

Erkekoglu P, Baydar T. (2012) 'Chronopharmacodynamics of drugs in toxicological aspects: A short review for clinical pharmacists and pharmacy practitioners'. *J Res Pharm Pract.*

Ferguson, P.J., M.D. Vincent, J. Koropatnick. (2017) 'Synergistic antiproliferative activity of the RAD51 inhibitor IBR2 with inhibitors of receptor tyrosine kinases and microtubule protein'. *J Pharmacol Exp Ther.*

Flevaris P, *et al.* (2009) 'Two distinct roles of mitogen-activated protein kinases in platelets and a novel Rac1-MAPK-dependent integrin outside-in retractile signaling pathway'. *Blood.*113(4):893-901. doi: 10.1182/blood-2008-05-155978.

Focan C. (1987) 'Chronobiology and biochemical markers of human cancer'. *Pathol Biol.* 35(6):951-9.

Foldynová-Trantírková S, *et al.* (2010). 'Breast cancer-specific mutations in CK1 ϵ inhibit Wnt/ β -catenin and activate the Wnt/Rac1/JNK and NFAT pathways to decrease cell adhesion and promote cell migration'. *Breast Cancer Res.* doi: 10.1186/bcr2581.

Gao, Y., *et al.*, (2004) 'Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor'. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(20): p. 7618-23.

Goldsmith CS, *et al.* (2018) 'Inhibition of p38 MAPK activity leads to cell type-specific effects on the molecular circadian clock and time-dependent reduction of glioma cell invasiveness'. *BMC Cancer*. doi: 10.1186/s12885-017-3896-y.

Gonzalez-Aponte, MF y Damato, AR; Trebucq, LL; Simon, T; Cardenas-Garcia, PS; Cho, K; Patti, GJ; Golombek, DA; Chiesa, JJ; Herzog, E. (2023) 'Sensitivity to the chemotherapy agent Temozolomide depends on circadian time of treatment in glioblastoma'. *Journal of Neuro-oncology*, en revisión.

Granda TG, *et al.* (2002). 'Circadian optimisation of irinotecan and oxaliplatin efficacy in mice with Glasgow osteosarcoma'. *Br J Cancer*.

Greco, W.R., G. Bravo, J.C. Parsons (1995). 'The search for synergy: a critical review from a response surface perspective'. *Pharmacol Rev.* 47(2): p. 331-85

Hainich EC, Pizzio GA, Golombek DA (2006) 'Constitutive activation of the ERK-MAPK pathway in the suprachiasmatic nuclei inhibits circadian resetting'. *FEBS Lett.* doi: 10.1016/j.febslet.2006.11.019.

Hart, M.J., *et al.*, (1994) 'Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product'. *J Biol Chem*, 269(1): p. 62-5.

Heske, C.M., *et al.* (2017) 'Matrix screen identifies synergistic combination of PARP inhibitors and nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors in Ewing sarcoma'. *Clin Cancer Res*.

Hill RJW, Innominato PF, Lévi F, Ballesta A. (2020) 'Optimizing circadian drug infusion schedules towards personalized cancer chronotherapy'. *PLoS Comput Biol.* 16(1):e1007218. doi: 10.1371/journal.pcbi.1007218.

Hodge RG, Ridley AJ. (2016) 'Regulating Rho GTPases and their regulators'. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 17(8):496-510. doi: 10.1038/nrm.2016.67.

Karnoub, A.E., *et al.*, (2001) 'Molecular basis for Rac1 recognition by guanine nucleotide exchange factors'. *Nat Struct Biol.* 8(12): p. 1037-41.

Kervezee L, *et al.* (2017) 'Diurnal variation in the pharmacokinetics and brain distribution of morphine and its major metabolite'. *Eur J Pharm Sci.*

Khan S, Liu Y, Siddique R, Nabi G, Xue M HH (2019). 'Impact of chronically alternating light-dark cycles on circadian clock mediated expression of cancer (glioma)-related genes in the brain'. *Int J Biol Sci.* 15: 1816–34.

Kobuchi S, Yazaki Y, Ito Y, Sakaeda T (2018). 'Circadian variations in the pharmacokinetics of capecitabine and its metabolites in rats'. *Eur J Pharm Sci.* doi: 10.1016/j.ejps.2017.11.021

Lee, Y., *et al.* (2021) 'Time-of-day specificity of anticancer drugs may be mediated by circadian regulation of the cell cycle'. *Science Advances.* doi: 10.1126/sciadv.abd2645

Levi F, *et al.* (1993) 'Oxaliplatin activity against metastatic colorectal cancer. A phase II study of 5-day continuous venous infusion at circadian rhythm modulated rate'. *Eur J Cancer.*

Lévi F, Zidani R, Misset JL (1997). 'Randomised multicentre trial of chronotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid in metastatic colorectal cancer'. *Lancet*. doi: 10.1016/S0140-6736(97)03358-8.

Liang J, *et al.* (2021) 'Rac1, A Potential Target for Tumor Therapy. *Front Oncol*'. 11:674426. doi: 10.3389/fonc.2021.674426.

Lozano, E., Betson, M., Braga, V.M. (2003) 'Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion'. *Bioessays*, 25(5): p. 452-63.

Luo Y, *et al.* (2009) 'Expression profiling reveals a positive regulation by mPer2 on circadian rhythm of cytotoxicity receptors: Ly49C and Nkg2d'. *Chronobiol Int*. 26(8):1514-44. doi: 10.3109/07420520903553435.

Ma N, Xu E, Luo Q, Song G. (2023) 'Rac1: A Regulator of Cell Migration and a Potential Target for Cancer Therapy'. *Molecules*. 28(7):2976. doi: 10.3390/molecules28072976.

Madden MH, *et al.* (2014) 'Circadian pathway genes in relation to glioma risk and outcome'. *Cancer Causes Control*. doi: 10.1007/s10552-013-0305-y.

Mainiero F, *et al.* (2000) 'RAC1/P38 MAPK signaling pathway controls beta1 integrin-induced interleukin-8 production in human natural killer cells'. *Immunity*. 12(1):7-16. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80154-5.

Marchenay C, *et al.* (2001) 'Circadian variation in O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in circulating blood mononuclear cells of healthy human subjects'. *Int J Cancer*. 91(1):60-6. doi: 10.1002/1097-0215(20010101)91:1<60::aid-ijc1010>3.0.co;2-n.

Martineau-Pivoteau N, *et al.* (1996) 'Circadian variation in O6- methylguanine-DNA methyltransferase activity in mouse liver'. *Anticancer Drugs*. 7(6):703- 709.

Mekala JR, Adusumilli K, Chamarthy S, Angirekula HSR (2023). 'Novel insights on therapeutic, prognostic, and diagnostics aspects of non-coding RNAs in glioblastoma multiforme'. *Metab Brain Dis*. 38(6):1801-1829. doi: 10.1007/s11011-023-01234-2.

Muller PY, Milton MN (2012) 'The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development'. *Nature Reviews Drug Discovery*. doi: 10.1038/nrd3801.

Parri M, Chiarugi P. (2010) 'Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control'. *Cell Commun Signal*. 8:23. doi: 10.1186/1478-811X-8-23.

Petković M, Henis M, Heese O, Relógio A (2023) 'Chronotherapy in Glioblastoma: state of the art and future perspectives'. *EBioMedicine*. 89:104470. doi: 10.1016/j.ebiom.2023.104470.

Relógio A, *et al.* (2014) 'Ras-Mediated Deregulation of the Circadian Clock in Cancer'. *PLoS Genet*. doi: 10.1371/journal.pgen.1004338.

Roemeling R V., Hrushesky WJ. (1987) 'Circadian pattern of continuous FUDR infusion reduces toxicities'. *Prog Clin Biol Res*.

Roemeling R V., Hrushesky WJ. (1987) 'Circadian pattern of continuous FUDR infusion reduces toxicities'. *Prog Clin Biol Res*.

Rossmann, K.L., C.J. Der, J. Sondek, (2005) 'GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors'. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(2): p. 167-80.

Rousseau A, *et al.* (2023) 'Clinical outcomes by infusion timing of immune checkpoint inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer'. *Eur J Cancer*. 182:107-114. doi: 10.1016/j.ejca.2023.01.007.

Ruben MD, Smith DF, FitzGerald GA, Hogenesch JB (2019). 'Dosing time matters'. *Science*. doi: 10.1126/science.aax7621.

Salhia, B., *et al.* (2008) 'The guanine nucleotide exchange factors trio, Ect2, and Vav3 mediate the invasive behavior of glioblastoma'. *Am J Pathol*. 173(6): p. 1828-38.

Sallam H, *et al.* (2015) 'The effect of circadian rhythm on pharmacokinetics and metabolism of the Cdk inhibitor, roscovitine, in tumor mice model'. *Chronobiol Int*. doi: 10.3109/07420528.2015.1022782.

Sander D., *et al.* (1998) 'Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase'. *J Cell Biol*. 143(5): p. 1385-1398.

Sanz-Moreno, V., *et al.*, (2008) 'Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement.' *Cell*. 135(3): p. 510-23.

Sapienza L.G., *et al.* (2021) 'Clinical effects of morning and afternoon radiotherapy on high-grade gliomas'. *Chronobiol Int*.

Scherholz ML, Schlesinger N, Androulakis IP. (2019) 'Chronopharmacology of glucocorticoids'. *Adv Drug Deliv Rev*. 151-152:245-261. doi: 10.1016/j.addr.2019.02.004.

Schmiegelow K, Glomstein A, Kristinsson J, Salmi T, Schröder H, Björk O. (1997) 'Impact of morning versus evening schedule for oral methotrexate and 6-mercaptopurine on relapse risk for children with acute lymphoblastic leukemia'. *Am J Pediatr Hematol Oncol*.

Shutes A, (2007). 'Specificity and mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases'. *J Biol Chem*. 282(49):35666-78. doi: 10.1074/jbc.M703571200.

Simon AR, *et al.* (2000) 'Regulation of STAT3 by direct binding to the Rac1 GTPase'. *Science*. 290(5489):144-7. doi: 10.1126/science.290.5489.

Slat E.A., *et al.* (2017) 'Cell-intrinsic, Bmal1-dependent circadian regulation of temozolomide sensitivity in glioblastoma'. *J Biol Rhythms*. 32(2):121–129.

Stanton, AV. (1998) 'Calcium channel blockers. The jury is still out on whether they cause heart attacks and suicide'. *BMJ*. 316(1471–3).

Tahara, Y. and S. Shibata, (2014). Chrono-biology, chrono-pharmacology, and chrono-nutrition. *J Pharmacol Sci*, 124(3): p. 320-35.

Trebucq, Laura L, Marpegan, Luciano, Golombek, Diego A., Chiesa, Juan J. (2020) 'What, how and (especially) when: chronopharmacological approach in cancer therapies.' *Sleep Science*.

Ueda HR, *et al.* (2005) 'System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks'. *Nat Genet* 37: 187–192

Varghese RT, *et al.* (2018) 'Casein Kinase 1 Epsilon Regulates Glioblastoma Cell Survival'. *Sci Rep*. doi: 10.1038/s41598-018-31864-x.

Wagner PM, *et al.* (2021) 'Temporal regulation of tumor growth in nocturnal mammals: In vivo studies and chemotherapeutical potential'. *FASEB J.* 35(2):e21231. doi: 10.1096/fj.202001753R. PMID: 33428275.

White WB, LaRocca GM (2002). 'Chronopharmacology of cardiovascular therapy'.
Blood Pressure Monitoring.

Wu, X., *et al.* (2011) 'A minimal Rac activation domain in the unconventional guanine nucleotide exchange factor Dock180'. *Biochemistry.* 50(6): p. 1070-80

Yassine M, *et al.* (2022) 'Radiotherapy of the Hepatocellular Carcinoma in Mice Has a Time-Of-Day-Dependent Impact on the Mouse Hippocampus'. *Cells.* 12(1):61. doi: 10.3390/cells12010061.

Yu M, *et al.* (2018) 'Circadian regulator NR1D2 regulates glioblastoma cell proliferation and motility'. *Oncogene.* 37(35):4838-4853. doi: 10.1038/s41388-018-0319-8.

Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch JB (2014) 'A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine'. *Proc Natl Acad Sci U S A.* doi: 10.1073/pnas.1408886111.

Discusión y conclusiones generales

El presente trabajo tuvo como finalidad estudiar el rol que posee el sistema circadiano sobre la progresión y fisiología del GBM, centrándose en diversos procesos. Por un lado, mediante la generación de células de GBM deficientes en la expresión de *bmal1*, o a través de la exposición de los ratones a luz constante, se analizó respectivamente el control circadiano ejercido por el propio tumor, o por el ratón hospedador, sobre la proliferación y prognosis tumoral (Capítulo I), observándose que estos procesos dependen del propio reloj circadiano tumoral. En segunda instancia, se estudió la remodelación del microambiente tumoral, centrando el análisis en la reactividad de los astrocitos peri-tumorales (Capítulo II), observándose que estos procesos también dependen del reloj circadiano tumoral en este modelo de GBM. Finalmente, se realizó un estudio cronofarmacológico de la droga novedosa 1A-116 y la droga utilizada actualmente, la TMZ (Capítulo III), de manera tal de poder pensar en nuevas y mejores estrategias quimioterapéuticas para el GBM, que tengan como eje los ritmos circadianos en la efectividad de los fármacos. Se observó que la efectividad de 1A-116 sobre una diversidad de procesos tumorales (proliferación, migración, apoptosis) al igual que la efectividad del tratamiento sobre ratones *nude* presenta un ritmo circadiano.

Nuestros resultados sugieren que el reloj circadiano posee un rol fundamental en la regulación de la proliferación y prognosis de las células LN229, modelo de GBM. El gen reloj *bmal1* surge en este contexto como un posible gen supresor de tumores, donde su ausencia colabora en generar fenotipos más agresivos del tumor. Estos resultados se encuentran en línea con la idea de que existe una interacción bidireccional entre el reloj molecular y el reloj celular, interacción que se encuentra altamente regulada para garantizar la homeostasis

celular. Por lo tanto, y como ya ha sido descrito, frente al desbalance de alguno de los factores que se encuentran implicados en dicha interacción, se evidencian mecanismos tendientes a promover el cáncer. En ese sentido, nuestros resultados sugieren un fuerte rol del reloj molecular tumoral en este proceso, no siendo así el del reloj central cuando se evalúan esquemas de interrupción de los ritmos circadianos mediante luz constante. Cuando los ratones fueron expuestos a este esquema, resultando en un alargamiento del periodo, pero no en arritmicidad del ritmo comportamental, no se evidenciaron diferencias en la proliferación y prognosis tumoral. Sin embargo, dada la vasta bibliografía en torno al efecto que esquemas de luz desincronizantes como el jet-lag crónico, poseen sobre la progresión tumoral, es necesario continuar investigando en este sentido para profundizar el rol que diversos esquemas de luz pueden llegar a tener sobre la proliferación y prognosis del GBM.

Utilizando el mismo enfoque, se centró el estudio en el microambiente tumoral, analizando la reactividad de los astrocitos peri-tumorales. Nuevamente se comprobó que la desregulación de *bmal1* en las células LN229 generó una mayor reactividad de los astrocitos circundantes, evidenciada como una mayor expresión de la proteína GFAP, y una mayor expresión del marcador de prognosis tumoral CD44 en las células tumorales en estadios tempranos del GBM. Si bien el esquema de luz constante no generó mayor expresión de CD44, sí incrementó la expresión de GFAP en estadios tempranos, indicando que la luz constante actúa como un estresor en el microambiente astrocitario. Es necesario profundizar estos estudios para analizar de qué manera las vías y mensajeros fóticos circadianos puedan regular salidas neurales o humorales hacia la región del GBM, generando mayor reactividad en el microambiente tumoral.

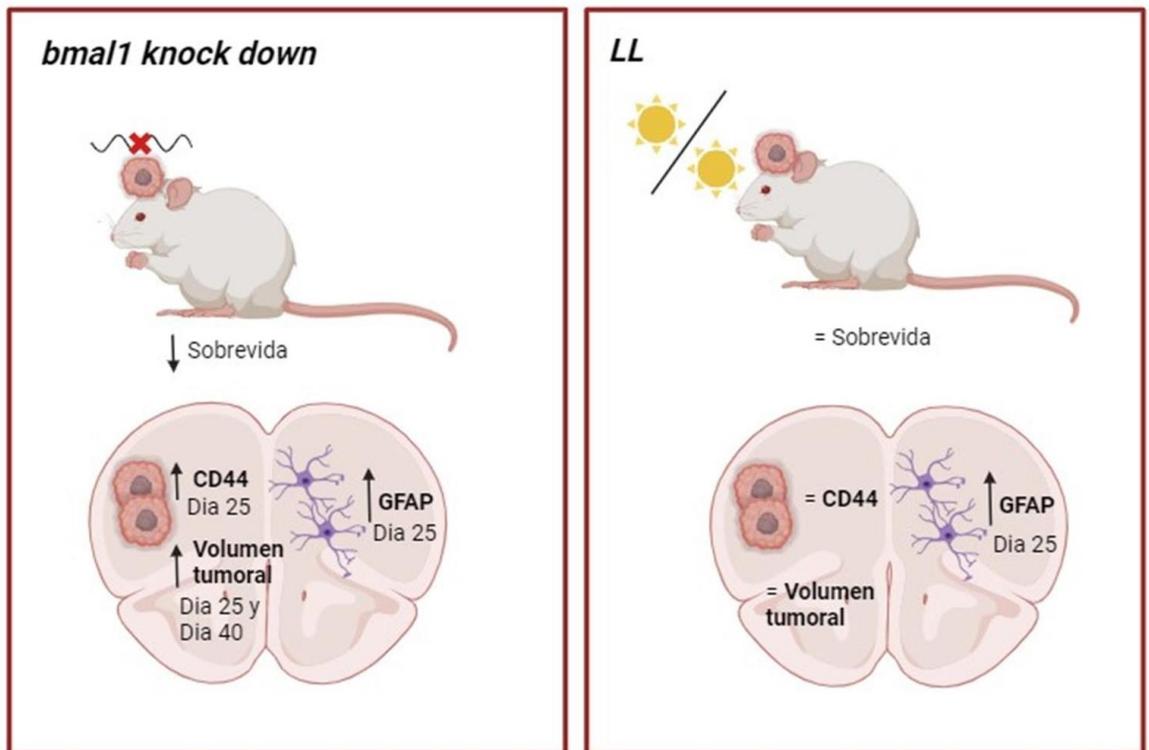
Puede concluirse, por lo tanto, que *bmal1* regula la proliferación, prognosis, expresión de CD44, y reactividad astrocitaria peri-tumoral en estadios tempranos del tumor. Estos resultados colaboran en comprender la dinámica del GBM, la cual es sumamente compleja y ya ha sido demostrado que es muy distinta y heterogénea, dependiendo si se están estudiando células madre o células establecidas, células en estadios tempranos o tardíos, etc. En ese sentido, es fundamental continuar analizando de qué manera y a través de qué vías de señalización *bmal1* lleva adelante esta regulación, ya que profundizar en la comprensión de este fenómeno puede colaborar en diseñar estrategias terapéuticas que tengan a *bmal1*, u otros genes reloj, como blanco. En ese sentido, es posible hipotetizar un control de *bmal1* sobre CD44 (de forma directa mediante E-boxes, o de forma indirecta a través de otras proteínas).

Finalmente, y pensando justamente en potenciar las terapias para tratar el GBM, se llevó a cabo un estudio cronofarmacológico de la droga novedosa 1A-116 y la actualmente utilizada, TMZ. Evidenciamos que la droga 1A-116 posee una efectividad dependiente del reloj circadiano, no siendo así para la concentración de TMZ evaluada en modelos murinos. Estos resultados apuntan a la tendencia actual de comenzar a considerar a la cronofarmacología cada vez más como un enfoque interesante a la hora de potenciar los efectos terapéuticos de las drogas ya existentes, y disminuir sus efectos secundarios. Analizar si los blancos oncológicos poseen un ritmo circadiano colabora en pensar en estrategias cronofarmacológicas. Nuestros resultados demuestran que el blanco de la droga 1A-116, TIAM1, posee un ritmo circadiano en fase con el ritmo de efectividad de la droga 1A-116. Dichos ritmos desaparecen en la línea celular LN229E1, deficiente en *bmal1*, lo cual permite

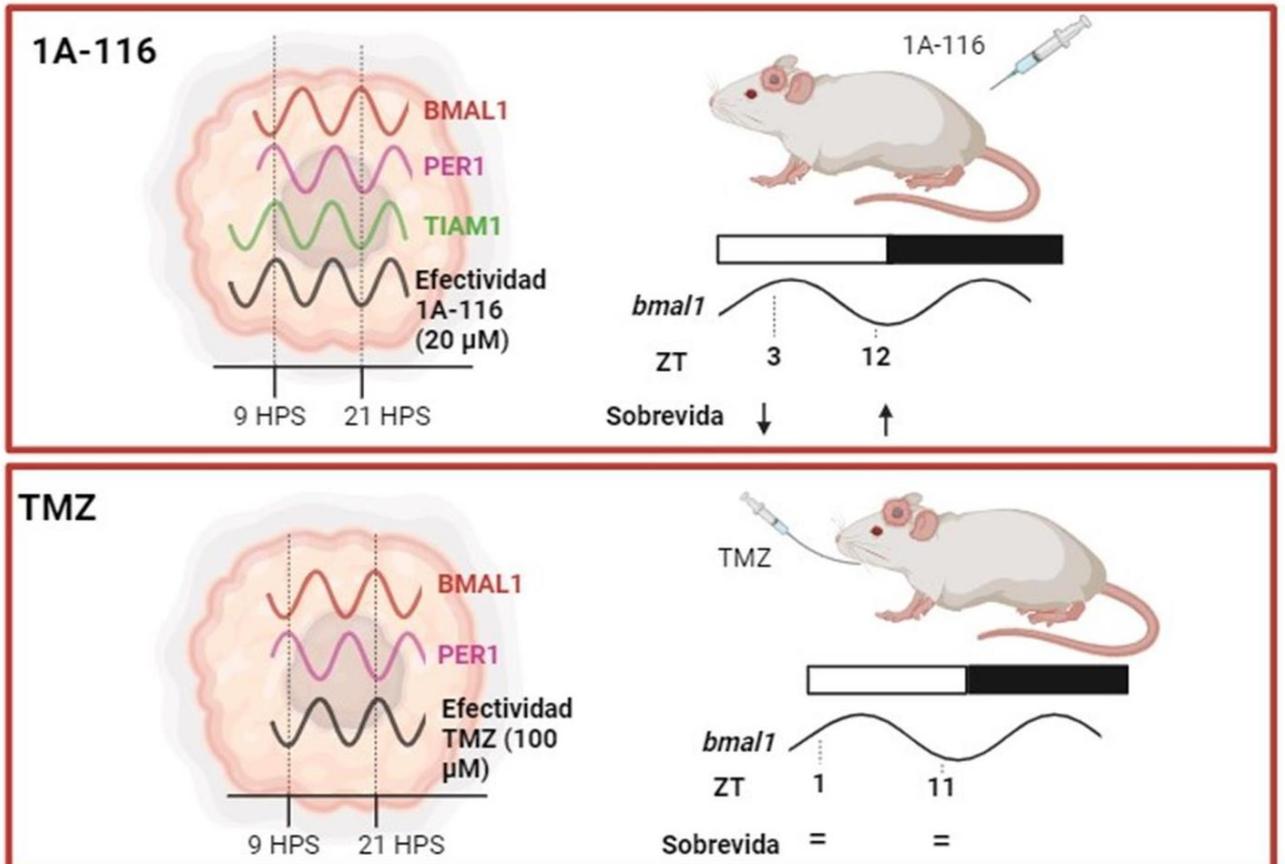
hipotetizar un control de *bmal1* sobre TIAM1, y, por ende, sobre el efecto cronoterapéutico de 1A-116.

Por otro lado, estos efectos cronoterapéuticos no fueron observados con la droga TMZ en modelos murinos en las concentraciones y horarios evaluados. Estos resultados ayudan a pensar en futuros tratamientos combinados para el GBM, que tengan al momento del día como una característica clave a tener en cuenta a la hora de pensar terapias anti-tumorales.

Los hallazgos de la presente tesis se encuentran resumidos en los Esquemas 1 y 2.



Esquema 1. Resumen de los resultados de los Capítulos I y II.



Esquema 2. Resumen de los resultados del Capítulo III.

ANEXO.

**Proliferación y prognosis
del GBM en ratones
macho y hembra.**

1. Introducción

En los últimos años, comenzó a ser cada vez más fundamental la necesidad de llevar adelante los estudios científicos en modelos animales que incluyan tanto machos como hembras, y a nivel clínico, tanto en hombres como en mujeres, para de esta manera evitar sesgos en las conclusiones. Diversos aspectos de la fisiología y el metabolismo de machos y hembras son muy distintos, por lo que elaborar conclusiones solamente en machos, como históricamente se ha hecho, colabora en los sesgos de las investigaciones y de las conclusiones a las que se arriban. Sobre todo, se deja de lado el conocimiento a nivel preclínico que esa investigación en particular puede tener de valor traslacional sobre las mujeres (Cislak *et al.*, 2018). Incluso el hecho de que los hombres se encuentren sobrerrepresentados en los estudios clínicos de diversas drogas trae consecuencias graves para la salud de las mujeres (Correa de Araujo, 2006), como mayores y peores efectos secundarios de muchas de las drogas aprobadas en las últimas décadas (U.S. Government Accountability Office, GAO-01-286R, 2001). Es en ese sentido, entonces, que en la presente tesis doctoral nos preguntamos si el modelo de GBM utilizado presenta diferencias en ratones macho y hembras. Si bien tanto el Capítulo I, como el II y III fueron llevados adelante mayormente con ratones macho, esto responde a que el modelo de GBM utilizado en la presente tesis fue estudiado históricamente en machos por nuestro laboratorio, en parte por la costumbre extendida en todo el ámbito científico, pero también por una cuestión de falta de accesibilidad a ratones *nude* hembras. Por lo tanto, la presente tesis doctoral se llevó adelante mayormente en machos, ya que es el modelo que se encontraba puesto a punto. Sin embargo,

como primer acercamiento y a modo de puntapié inicial para comenzar a modelizar en el laboratorio el GBM también en hembras, llevamos adelante un estudio de crecimiento y de sobrevida en ambos sexos.

Ya se ha demostrado que el GBM posee mayor incidencia en hombres que en mujeres, y que, a su vez, las mujeres sobreviven más cuando contraen GBM (Ostrom *et al.*, 2018). Por otro lado, estas diferencias han sido asociadas a diferencias con respecto al sexo en el patrón de glicólisis del GBM (Ippolito *et al.*, 2017), en los ARNm que la célula expresa y en la respuesta a quimioterapia con TMZ (Yang *et al.*, 2019). Un trabajo reciente ha demostrado que las mutaciones encontradas en los tumores frecuentemente poseen diferencias también con respecto al sexo (Colopi *et al.*, 2023). Sin embargo, no hay muchos estudios en modelos murinos en los que se analice la diferencia en el crecimiento del GBM en machos y hembras. Por lo tanto, en el presente anexo nos dedicaremos a describir la prognosis y la proliferación de GBMs originados por implantes ortotópicos de células LN229 en ratones *nude* machos y hembras.

2. Materiales y métodos.

2.1. Análisis de sobrevida

Ratones *nude* macho y hembra fueron implantados con células LN229 según lo indicado en “Materiales y Métodos generales”. Dos veces por semana, se registró el peso y se observó la aparición de síntomas del glioblastoma (de al menos dos de los tres síntomas ya descritos como indicativos de la enfermedad: pérdida de entre el 20 y 25% del peso, pérdida de equilibrio, lordosis) hasta punto final experimental, analizando luego la sobrevida de cada grupo experimental.

2.2. Evaluación del tamaño tumoral y de la proliferación.

Para llevar a cabo el análisis del área tumoral y la proliferación, se utilizó el marcador Ki67. Las inmunohistoquímicas se llevaron a cabo siguiendo lo descrito en “Materiales y Métodos generales”, utilizando el anticuerpo primario 1/1000 Ki67 (Abcam, EE. UU) y 1/500 del anticuerpo secundario anti-conejo Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Posteriormente se realizaron las mediciones en el equipo *Cytation 5 Imaging Reader*, con objetivos de 2,5 X y 10 X y canales GFP (488/520) y DAPI (360/460).

2.3. Análisis de los resultados

2.3.1. Adquisición y procesamiento de imágenes

Las imágenes sin procesar se adquirieron y unieron automáticamente con el software GEN 5 en el sistema Cytation 5 y se procesaron con el software de análisis de imágenes Fiji (Schneider, Rasband y Eliceiri, 2012).

Para el volumen tumoral se analizaron imágenes fijando una región de interés sobre el tumor, lo que permitió obtener el área (en mm²). Luego, para obtener el

volumen tumoral (en mm³), se multiplicó el área por el factor: número de cortes con tumor obtenidos para cada cerebro x 0,035 mm.

Para determinar el índice de proliferación, las imágenes de inmunohistoquímica fueron analizadas estableciendo una región de interés en todo el tumor, luego se estableció un umbral y se midió la densidad integrada de Ki67, un marcador de proliferación tumoral.

2.3.2. Análisis estadístico.

Para analizar la significancia estadística de los datos, se realizó la prueba paramétrica prueba t de Student, considerando significativas a un $p < 0.05$.

Los tiempos de supervivencia de los ratones con tumores machos y hembras se analizaron utilizando las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, que luego se compararon mediante una prueba no paramétrica de rango logarítmico.

3. Resultados

3.1. Análisis de supervivencia

Al comparar la supervivencia de ratones *nude* machos y hembras frente al implante de células LN229, se evidencia que no hay diferencias significativas (Mantel-Cox, ns), obteniéndose en ambos casos una mediana de supervivencia de 56,5 días (Figura 8.1 A). Por otro lado, tampoco se evidencian diferencias significativas en los pesos (T-test, ns), pese a que se observa una tendencia de las hembras a perder menos peso en el punto final (valores mayores a 0, Figura 8.1 B).

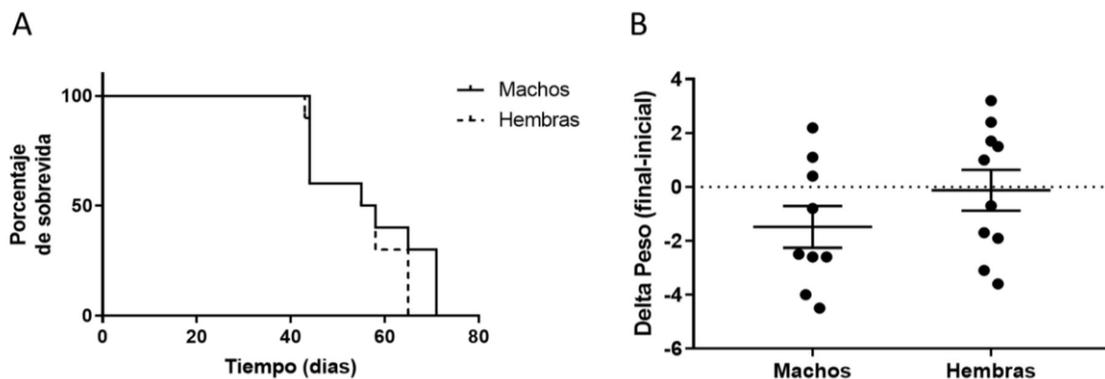


Figura 8.1. La supervivencia de machos y hembras implantados con células LN229 es igual. (A) Supervivencia de machos y hembras implantados con células LN229 (Mantel-Cox, ns. n=10). Mediana de supervivencia para ambos grupos: 56,5. (B) Delta de pesos (peso final-inicial) de machos y hembras implantados con LN229. (T-tests: ns. n=10).

3.2. Análisis del tamaño tumoral y de la proliferación.

Al analizar el volumen tumoral de los ratones macho y hembra implantadas con LN229, no se observan diferencias significativas entre ambos grupos (T-test, ns) obteniéndose valores de volumen tumoral en punto final similares a los ya obtenidos en la presente tesis en el Capítulo I (Figura 8.2 A). Por otro lado, se evaluó

la proliferación celular utilizando el marcador de proliferación ki67. Al igual que para el volumen tumoral, no se evidencian diferencias significativas en la proliferación de las células tumorales (Figura 8.2 B). La figura 8.2 C muestra imágenes representativas de la proliferación de las células, evidenciada mediante la marcación con el anticuerpo ki67.

Los resultados del presente Anexo sugieren que no hay diferencias con respecto al sexo en la supervivencia, pronóstico y crecimiento del modelo de GBM LN229 en ratones *nude*.

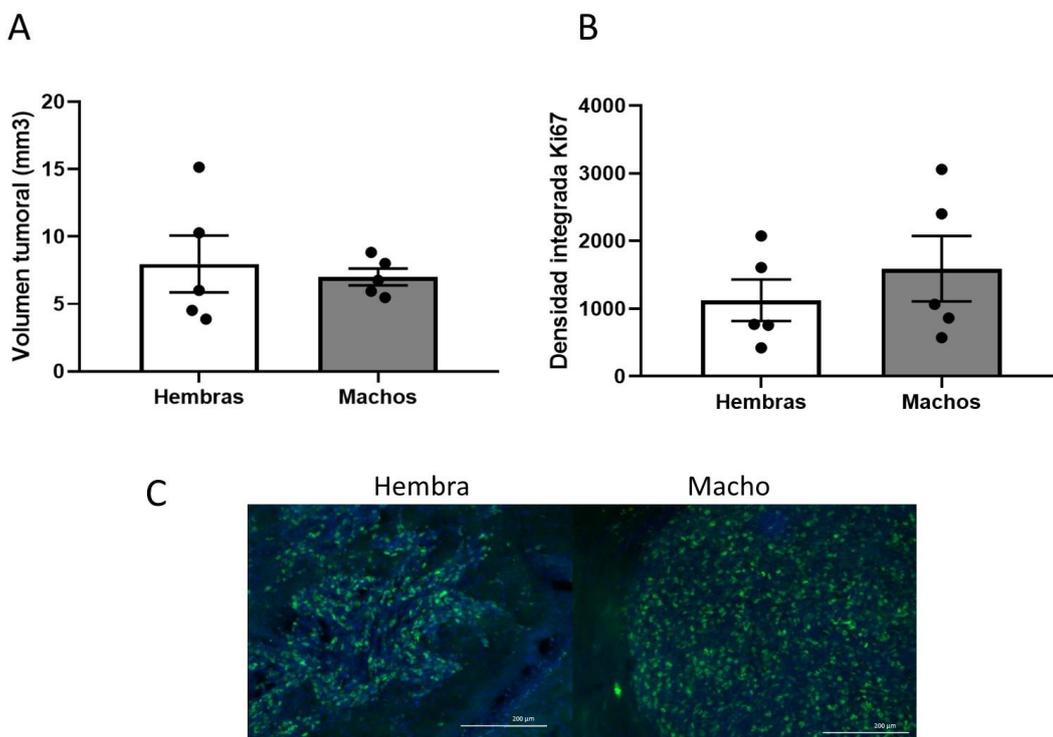


Figura 8.2. El volumen tumoral y el índice de proliferación es igual en ratones *nude* macho y hembra implantados con células LN229. (A) Volumen tumoral (medido en mm³) de machos y hembras implantados con LN229 (T-test; ns. n=5). (B) Índice de proliferación (expresado como

densidad integrada) medido con la proteína ki67 en machos y hembras implantados con células LN229 (T-test; ns. n=5). (C) Imágenes representativas de células LN229 tumorales en ratones *nude* machos y hembras, marcadas con el marcador de proliferación ki67 (verde) y DAPI (azul), con una magnificación de 10x. Las líneas blancas indican 200 μ m.

4. Discusión

El presente Anexo se propuso estudiar si existen diferencias en cuanto al sexo en la sobrevida y el crecimiento de ratones *nude* implantados con LN229, modelo de GBM utilizado a lo largo de esta tesis. Se evidencia que no se encuentran diferencias significativas tanto en la sobrevida, como en el peso, el volumen tumoral y la proliferación analizada con ki67. Estos resultados son similares a los obtenidos por Gonzalez-Aponte y Damato (sin publicar). Ya han sido descritas diferencias de crecimiento en el GBM con respecto al sexo en seres humanos (Ostrom *et al.*, 2018), y también se han evidenciado patrones moleculares diferentes en líneas celulares provenientes de hombres y mujeres (García *et al.*, 2021). Un trabajo reciente realizado en los modelos murinos C57BL6/J, RAG1 y NSG, con las células de GBM murinas SB28 y GL26, muestra que se evidencian diferencias ligadas al sexo en el crecimiento del GBM solamente en los ratones C57BL6/J, las cuales estarían asociadas a la infiltración de células T en el tumor (Lee *et al.*, 2023). Dichos resultados van en línea con los resultados obtenidos en la presente tesis, donde no se encuentran diferencias ligadas al sexo en ratones *nude*, modelo inmunodeficiente similar a los NSG y RAG1. Este es un punto importante a tener en cuenta a la hora de escalar los resultados obtenidos en modelos murinos a seres humanos, ya que la utilización de ratones inmunodeficientes en cáncer es sumamente común, sobre todo a la hora de evaluar fármacos. Muchas veces los resultados obtenidos en la toxicidad y efectividad de un fármaco (por ejemplo, el fármaco TMZ estudiado en el Capítulo III de la presente tesis), pueden no presentar diferencias entre ratones macho y hembra, pero sí presentar diferencias en cuanto al sexo en los seres humanos. Si bien existen una multiplicidad de diferencias ya descritas entre ratones

macho y hembra (tamaño, perfil hormonal, metabolismo), el hecho de que estos sean endocriados, característica que claramente no está presente en los seres humanos, genera que muchas diferencias en cuanto al sexo desaparezcan en este modelo animal (Gochfeld, 2016). Por lo tanto, es fundamental tomar como punto de partida los resultados obtenidos en modelos animales, pero siempre garantizar la representatividad del sexo biológico en los estudios clínicos que se realizan con seres humanos, de manera tal de evitar sesgos y situaciones no deseadas, como por ejemplo que la toxicidad de una droga pueda afectar más a un sexo que al otro.

Bibliografía del Anexo

Cislak A, Formanowicz M, Saguy T (2018). 'Bias against research on gender bias'. *Scientometrics*. 115(1):189-200. doi: 10.1007/s11192-018-2667-0.

Colopi A, *et al.* (2023) 'Impact of age and gender on glioblastoma onset, progression, and management'. *Mech Ageing Dev.* 211:111801. doi: 10.1016/j.mad.2023.111801.

Correa-de-Araujo, R. (2006). 'Serious gaps: How the lack of sex/gender-based research impairs health'. *Journal of Women's Health*, 15, 1116–1122.

García, C *et al.*, (2021). 'Functional Characterization of Brain Tumor-Initiating Cells and Establishment of GBM Preclinical Models that Incorporate Heterogeneity, Therapy, and Sex Differences'. *Mol Cancer Ther.* 20(12):2585-2597. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-20-0547.

Gochfeld M. (2016) 'Sex Differences in Human and Animal Toxicology: Toxicokinetics'. *Toxicologic Pathology.* 2017;45(1):172-189. doi:10.1177/0192623316677327

Ippolito JE, Yim AK, Luo J, Chinnaiyan P, Rubin JB (2017) 'Sexual dimorphism in glioma glycolysis underlies sex differences in survival'. *JCI Insight.* 2(15):e92142. doi: 10.1172/jci.insight.92142. PMID: 28768910; PMCID: PMC5543918.

Lee, J *et al.* (2023) 'Sex-biased T cell exhaustion drives differential immune responses in glioblastoma'. *Cancer Discov.* doi: 10.1158/2159-8290.CD-22-0869. Epub ahead of print. PMID: 37378557.

Ostrom QT, Rubin JB, Lathia JD, Berens ME, Barnholtz-Sloan JS (2018) 'Females have the survival advantage in glioblastoma'. *Neuro Oncol.* 20(4):576-577. doi: 10.1093/neuonc/noy002. PMID: 29474647; PMCID: PMC5909625.

U.S. Government Accountability Office, GAO-01-286R. (2001) 'Drug safety: Most drugs withdrawn in recent years had greater health risks for women'. Available at: <http://www.gao.gov/products/GAO-01-286R>.

Yang W, *et al.* (2019) 'Sex differences in GBM revealed by analysis of patient imaging, transcriptome, and survival data'. *Sci Transl Med.* 11(473):eaao5253. doi: 10.1126/scitranslmed.aao5253. PMID: 30602536; PMCID: PMC6502224.

Consideraciones finales

De la presente tesis surgieron las siguientes publicaciones:

- Timing of novel drug 1A-116 to circadian rhythms improves therapeutic effects against glioblastoma. Trebucq, LL, Cardama, GA, Lorenzano Menna, P; Golombek, DA; Marpegan, L; Chiesa, JJ. *Pharmaceutics*. 2021.

DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071091>

- What how and (especially) when: chronopharmacological approach in cancer therapies. Trebucq, LL; Marpegan, L; Golombek, DA; Chiesa, JJ. *Sleep Science*, DOI: 10.5935/1984-0063.20200021, 2020.

- Disruption of circadian gene *bmal1* increases tumor growth, CD44, and astrocytic peri-tumor GFAP expression in a nude mice model of human glioblastoma. Trebucq, LL; Salvatore, N; Wagner, PM; Golombek, DA; Chiesa, JJ. *Molecular Neurobiology*, en revisión.

-Sensitivity to the chemotherapy agent Temozolomide depends on circadian time of treatment in glioblastoma. Gonzalez-Aponte, MF y Damato, AR; Trebucq, LL; Simon, T; Cardenas-Garcia, PS; Cho, K; Patti, GJ; Golombek, DA; Chiesa, JJ; Herzog, E. *Journal of Neuro-oncology*, en revisión.

A su vez, la tesista colaboró en los siguientes proyectos, que se plasmaron en las siguientes publicaciones:

-Trebucq LL y Lamberti ML, Rota R, Aiello I, Borio C, Bilén M, Golombek DA, Plano SA, Chiesa JJ. Chronic circadian desynchronization of feeding-fasting rhythm

generates alterations in daily glycemia, LDL cholesterolemia and microbiota composition in mice. *Front Nutr.* 2023. Apr 14;10:1154647. doi: 10.3389/fnut.2023.1154647.

-Cysteine Oxidation Promotes Dimerization/Oligomerization of Circadian Protein Period 2. Baidanoff, F, Trebucq, LL, Plano, SA, Eaton, P, Golombek, DA, Chiesa, JJ. *Biomolecules.* 2022. DOI: 10.3390/biom12070892.

-Redox and Antioxidant Modulation of Circadian Rhythms: Effects of Nitroxyl, N-Acetylcysteine and Glutathione. Plano SA; Baidanoff, F; Trebucq, LL; Suarez, SA; Doctorovich, F; Golombek DA; Chiesa, JJ *Molecules.* 2021, 26(9), 2514; DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26092514>.

-Role of G-Substrate in the NO/cGMP/PKG Signal Transduction Pathway for Photic Entrainment of the Hamster Circadian Clock. Plano, SA; Dalessandro, MA; Trebucq, LL; Endo, S; Golombek, DA; Chiesa, JJ.2021. *ASN Neuro*, DOI: 10.1177/1759091420984920, 2021.

Finalmente, parte del presente trabajo de tesis obtuvo los siguientes premios:

-Premio “Fernando Rusquellas”, correspondiente al área Ciencias Biológicas, Bioquímicas, Biofísicas y Naturales, de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica (2021).

-Premio a la mejor presentación de póster al trabajo “Human glioblastoma cell’s response to the novel drug 1A-116 is dependent on the circadian clock”, Latin American Chronobiology Congress, Colonia del Sacramento, Uruguay. (2019).

-Primer premio al mejor póster realizado en el ámbito de la Provincia de Buenos Aires, al trabajo “Estudio cronofarmacológico de la droga 1A: un tratamiento

novedoso para el glioblastoma” entregado por el Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Buenos Aires, en el 72° Congreso Argentino de Bioquímica (2017).

El Capítulo I de la presente tesis fue llevado a cabo en colaboración con la Dra. Paula Wagner y el Dr. Mario Guido, del CIQUIBIC-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, quienes brindaron el plásmido de silenciamiento de *bmal1* por Crispr/Cas9.

El Capítulo III de la presente tesis fue llevado a cabo en colaboración con la Dra. Georgina Cardama y el Dr. Pablo Lorenzano Menna, del Laboratorio de Oncología Molecular de la Universidad Nacional de Quilmes, quienes brindaron la droga 1A-116 y el apoyo técnico asociado a la misma. Los experimentos con TMZ fueron llevados a cabo por la tesista en el laboratorio de Erik Herzog en Washington University in St. Louis, EE. UU, en colaboración con la Dra. Anna Damato.

Todas las figuras de la presente tesis fueron creadas con BioRender.com.

Agradecimientos

La presente tesis es fruto de un proceso largo de investigación, muchos años de esfuerzo y aprendizaje. Sin embargo, jamás las cosas se logran de forma individual, sino que es el esfuerzo y el apoyo colectivo el que nos permite avanzar como individuos. No hubiese podido llegar a esta instancia sin el apoyo de muchísimas personas, a las cuales me tomaré el trabajo de agradecerles en los siguientes párrafos.

En primera instancia, quiero agradecerle a Diego por la oportunidad de permitirme formar parte de este laboratorio, investigando lo que me hace feliz durante todos estos años. El Laboratorio de Cronobiología es un espacio lleno de aprendizajes y gente hermosa, en el cual fue muy lindo haberme desempeñado y haber conocido no solo a grandes colegas, sino también, a grandes amigos. Gracias a Juan, mi director, por el aguante, la paciencia, y el entendimiento a lo largo de estos años. Gracias por las charlas, y por el apoyo cuando transité momentos muy difíciles de mi vida. Gracias por la formación, y permitirme aprender tanto. Gracias a Luciano, “el flaco”, mi co-director, por el apoyo y el acompañamiento a la distancia en todo este proceso y desde hace tantos años.

Gracias Nacho, por ser mi héroe en todo este lío. Por ser un colega increíble, súper capacitado, con el cual pude tener charlas larguísimas y debates sobre mi laburo, charlas que fueron fundamentales para poder avanzar en muchas cosas. Pero fundamentalmente, por ser un amigo increíble. Siempre te lo dije, sin vos no hubiese llegado hasta acá. Tu apoyo en momentos muy duros, en los cuales sentía que no iba a poder llegar, me sostuvo para creer en mí misma y creer que siempre

se vienen momentos mejores, no importa cuán triste es lo que se está atravesando. Así que gracias una vez más. Te quiero muchísimo. Gracias a Juli, porque siempre tiene un rato para escuchar, para opinar, sobre el trabajo o lo personal. Es la palabra justa cuando no hay muchas palabras. Gracias por tomarte el tiempo de quedarte muchas veces después del horario laboral escuchándome, amiga. Sos una persona enorme y espero volver a trabajar juntas más temprano que tarde. Gracias a Meli, por la risa, la escucha el chiste justo en el momento más difícil. Tenes una capacidad y una inteligencia enormes para desarrollar tu laburo, fue un honor haber podido laburar codo a codo con vos el último tiempo en el proyecto que tuvimos juntas. Gracias a Cami, quien tiene una empatía descomunal. Esos mates y charlas después de hacer mil inmunos fueron fundamentales para ayudarme a avanzar. Gracias por escuchar cuando hablo de mis resultados, y cuando hablo de mis problemas también. Tenes un camino super interesante por delante, porque sos una profesional y persona excelente. Gracias a Vicky, Manu, Fran, Guido. Por traer tanta energía y risas al labo estos últimos años. Gracias por haberle puesto energía para retomar las juntadas grupales, que son tan importantes en el espacio de trabajo. Los quiero muchísimo y los voy a extrañar. Gracias a Nico, quien llegó al labo los últimos meses de mi doctorado, y cuya ayuda fue invaluable para poder terminar todos los experimentos. Gracias a las investigadoras de Crono: Ro, Pato, Nati y Lau, por siempre estar dispuestas a darme una mano con lo que sea que haya necesitado estos años. Por escuchar atentamente cuando necesito ayuda, y por siempre intentar ofrecer una solución. Gracias a Santi, que me acompañó en todo este proceso muchísimo. Te agradezco por haberte quedado conmigo todas las veces que necesitaba ayuda y no sabía cómo resolver un problema. Por los helados en los overnight o las facturas al día siguiente. Por el apoyo en un momento muy difícil

de mi vida. Voy a extrañar mucho trabajar con vos. Finalmente, a los ex crono: Lea, Nacho, Ivi, Agus, Lucho, Lu, Fer, Male, Jose (aunque ya no sos tan ex Crono desde que volviste) y Anas. Gracias por ser un grupo de amigos increíble, y por ser fantásticos profesionales. Aprendí muchísimo gracias a ustedes. Son los primeros que me inculcaron, a través de larguísimas charlas y debates, la importancia de hacer ciencia por y para la sociedad, y comunicarla. Y por eso, siempre les voy a estar agradecida. Puntualmente, quiero agradecer a Ivi, Male y Lu, quienes siempre, pero sobre todo este último año, fueron un apoyo fundamental en poder avanzar y terminar esta tesis. Gracias a su escucha, su experiencia como mujeres profesionales, compartir sus tristezas también. Son una guía para mí, las quiero y las admiro muchísimo. Ojalá algún día pueda tener la templanza y la capacidad que tienen para desempeñarse en su vida.

Gracias a Mu, mis compañeros de militancia desde hace ya 7 años. A todos quienes han pasado por la agrupación, pero especialmente a Facu, Lauti, Pau, Lula, Agus, Lauy, Luqui, Vane y Emi. Mu ha sido siempre para mí un espacio de debate profundo, de reflexión, de discusión, de amistad. Creo que todos deberíamos tener un espacio así en nuestro paso por la universidad pública y gratuita. Gracias por siempre escucharme, darme un espacio, hacerme pensar más allá de mis límites. Gracias por haber construido un lugar de representación tan importante para estudiantes y graduados. ¡Los quiero muchísimo!

A continuación, quiero agradecer a muchos otros amigos, no asociados al trabajo. Primero, a los amigos que me dejó la facultad. Ispi, Nacho (de nuevo), Xime, Male Moyano, Lei, Caro, Maru, Lu G. Soy una persona muy agradecida por tenerlos, y estoy super feliz que tantos años después de haber terminado la facu, sigamos

juntándonos y siendo amigos, cada uno desde sus espacios profesionales. Los admiro muchísimo y aprendo todos los días de ustedes un montón. Especialmente, quiero agradecer a Male Moyano, quien a esta altura además de una amiga ya es una hermana. Son incontables las cosas que hemos vivido juntas, y siempre estamos para ponernos el hombro mutuamente. Sin vos creo que no hubiese terminado la carrera, siempre estamos pensando lo que piensa la otra sin decírnoslo. Te adoro muchísimo y por muchos años más. Y a Ispi, por estar siempre ahí para escucharme, hacerme reír, hacerme una comidita con vermucito cuando estoy triste, y hablar horas y horas sobre la vida y la ciencia.

Quiero agradecer a mis amigos de toda la vida, mis hermanos que me hacen quien soy y me sostienen día a día, en todas las situaciones que se puedan presentar. No hay palabras para describir cuánto los adoro. A Marian, Marito y Pili, mi bastión de resistencia, apoyo moral constante, balsa en el quilombo. Gracias por todo, tantos años de amor y entrega. Los admiro, los amo, los voy a seguir a cualquier parte del mundo o del universo pase lo que pase. A Yani y Sofi, mis hermanas elegidas. Gracias por sacarme del fondo del pozo tantas veces. Gracias por estar donde haya que estar tan solo con un mensajito. Gracias por los viajes, el aguante, las familias que ya son un poco de todas. Por siempre crear un espacio en el que se puede hablar con sinceridad de cualquier cosa, porque nunca se juzga. ¡Para toda la vida seguiremos codo a codo! Gracias a Male, Sofi Ro y Stefi, mi equipo ganador. En las buenas y en las malas siempre ahí, a como dé lugar. Gracias por siempre creer en mí y empujarme a seguir adelante. Gracias por la palabra justa, las horas de charla, la música, el amor, los viajes, los libros, por ser tan parecidas en tantas cosas que nos unen y tan distintas en tantas cosas que me enseñan a ser mejor persona y crecer. No sé cómo habría llegado hasta acá hoy sin ustedes.

Gracias a Eugi, mi uruguayana querida. Gracias por tantos años de amor y acompañamiento. Ya lo sabes, tu amistad me trae paz y siempre me ayuda a repensarme hasta en los peores momentos. Esta es una amistad que va a continuar estés donde estés, para toda la vida. Gracias y más gracias.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia. A mis primos y a mis tíos, y a mi sobrinita Manu, por ser una familia tan hermosa y constante y presente. Por abrazar en todo momento de la vida y contener y hacer reír y llorar juntos. Los amo.

A Juan Manuel, el amor de mi vida. Por creer en mí, no dejarme bajar los brazos, acompañarme a overnights, encargarse de absolutamente todo en la vida cuando lo único que podía hacer era estar en el labo haciendo mil experimentos. Por sostenerme desde el amor, en momentos donde uno está bien y en los que no está bien también. Por amarme, aun cuando se está agotado o enojado. Por siempre apostar a esta familia que estamos construyendo. Por apostar en mí, por ayudarme a ser mejor persona, y por entenderme de maneras que no se pueden explicar, que van más allá de todas las cosas. Te amo, esta tesis sin lugar a dudas es también un poco tuya. Gracias también a todos los que vinieron con vos a mi vida: tus amigos, tu familia, quienes ya son amigos y familia mía también.

Gracias a Clari y a mi mamá. Mis dos pilares en la vida. Mujeres fuertes que me han sacado adelante en todos los momentos imaginables. Clari, mi hermanita, te amo y agradezco a la vida tener una hermana como vos, que es mi amiga, mi sostén, mi ejemplo a seguir en tantas cosas. Ma, sos enorme. Hoy no estaría acá si no fuese por vos. Agradezco la fuerza con la que te pusiste la familia al hombro. Como siempre nos ayudaste para poder alcanzar nuestros sueños, sin pedir nada a cambio, sin juzgar. Como siempre te entregas completamente para que podamos

ser felices. Como nos acompañas a tomar decisiones siempre desde el amor, guiando, no aleccionando. Gracias por ser mi familia hermosa, pequeña, pero enorme.

A mi viejo, que ya no está acá pero que lo tengo presente en cada decisión que tomé y en cada encrucijada que me encuentro. Te extraño, pa. Te dedico todo este laburo y esfuerzo a vos, sé que estas orgulloso donde sea que estés. Gracias por haberme enseñado la importancia de ser fiel a nuestros principios, desde la solidez y el respeto.

Gracias a la Universidad Pública, mi querida Universidad Nacional de Quilmes, y al CONICET. No existe la meritocracia, son los sistemas que nos sostienen los que nos permiten avanzar en las cosas. Y yo soy una hija de la educación pública, nada de lo que tengo hoy día podría haber sido posible sin la UNQ y el CONICET. Aguante la educación pública y la ciencia soberana. Defendamos los derechos conquistados, y nunca nos olvidemos de dónde venimos.