RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Baidanoff, Fernando Martín

Modulación de la sincronización fótica del reloj circadiano en mamíferos

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/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:
Baidanoff, F. M. (2018). Modulación de la sincronización fótica del reloj circadiano en mamíferos. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina : Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes
http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/833

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

Universidad
Nacional
de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Baidanoff, Fernando Martín, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
junio de 2017, 179 pp.,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencia y Tecnología

Modulación de la sincronización fótica del reloj circadiano en mamíferos

TESIS DOCTORAL

Fernando Martín Baidanoff

fbaidanoff@gmail.com

Resumen

Desde el origen de la vida en la Tierra, todos los organismos vivos han estado evolucionando bajo una fuerte presión de selección: el ciclo de luz/oscuridad de 24 h de duración. Este hecho generó que durante la evolución surgiera un sistema que permitiese a los organismos ajustarse temporalmente (sincronizarse) a esta oscilación lumínica de 24 h: el sistema circadiano. Los ritmos circadianos son oscilaciones de aproximadamente 24 h de período, que pueden ser evidenciadas en todos los niveles de organización biológica. El sistema circadiano en los mamíferos, consiste de: i. un reloj central cerebral localizado en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo (NSQ), que genera y sincroniza los ritmos; ii. vías eferentes que transmiten señales neurohumorales desde este reloj central, imponiendo una periodicidad circadiana sobre el resto del organismo; y iii. vías aferentes que detectan y transmiten claves temporales para la sincronización del reloj. Estas claves son tanto de naturaleza endógena (p. ej., feedbacks hormonales, metabólicos) como exógena (ambientales), siendo la luz la más importante para sincronizar al reloj central. En organismos con organización jerárquica como los mamíferos, la sincronización por luz del reloj central cerebral mantiene una homeostasis fisiológica circadiana coordinando temporalmente osciladores periféricos del organismo. Para poder estudiar la respuesta del sistema circadiano, es necesario analizar las salidas rítmicas fisiológicas y comportamentales del reloj, como por ejemplo el ciclo de actividad/reposo. Los hámsters realizan una gran actividad volitiva en rueda, permitiendo obtener muy buenos registros de esta variable en series temporales que son observadas en actogramas. Bajo ciclos artificiales de 14 h luz: 10 h oscuridad (LO 14:10) en el laboratorio, estos animales son nocturnos. Típicamente en la naturaleza los roedores nocturnos salen y entran de su cueva durante la noche evitando exponerse a depredadores (mayormente diurnos en el curso evolutivo). Tanto en condiciones de laboratorio, como en la naturaleza, el sistema circadiano se encuentra sincronizado al ciclo lumínico exógeno. En cambio, cuando los animales son mantenidos en condiciones de oscuridad constante (OO), el reloj biológico endógeno pierde las claves temporales sincronizadoras del ciclo de LO y entra en libre curso, Fernando Martín Baidanoff - 2017 7 siendo el propio reloj endógeno el que mantiene el ciclo de actividad/reposo.

En estas condiciones, pueden administrarse estimulaciones lumínicas breves [pulsos de luz (PL)], simulando los crepúsculos naturales, para modificar la actividad del reloj circadiano y estudiar su capacidad de sincronización. La sincronización fótica del reloj biológico en mamíferos se entiende fácilmente si se traza el paralelismo con poner en hora un reloj analógico. Mover hacia adelante o hacia atrás las agujas del reloj biológico, se logra adelantando o retrasando la fase de su oscilación circadiana endógena. Retrasos y adelantos de fase del ritmo circadiano de actividad locomotora de hamsters son generados por PL durante la noche subjetiva temprana o tardía, respectivamente. Este protocolo experimental permite analizar la acción de diferentes agentes farmacológicos sobre la sincronización fótica de mamíferos. La cascada de transducción de señales involucrada en la sincronización por luz requiere la activación de la Óxido Nítrico Sintasa neuronal (nNOS) y el incremento en los nivles de Óxido Nítrico (NO). Sin embargo, río debajo de ésta enzima, la vía se bifurca: en el caso de los adelantos, el NO intra- y extracelular activa Guanilato Ciclasa soluble (sGC) causando un incremento de guanosil monofosfato cíclico (cGMP); mientras que para los retrasos de fase, el NO genera la apertura del receptor de Rianodina tipo II (RyRII) del retículo endoplasmático, cumpliendo un rol exclusivamente intracelular e independiente de cGMP. Estas dos vías del NO son las comúnmente conocidas como vía dependiente e independiente de cGMP, que para el caso de la sincronización del reloj central, coincide con una vía extracelular o intracelular del NO, respectivamente. Estudios en otras estructuras cerebrales proponen que la acción dual de la nNOS estaría relacionada con la capacidad de generar tanto NO (mensajero gaseoso) como Glutatión-S-nitrosilado (GSNO), éste último generaría la apertura del RyRII por Snitrosilación (y oxidación) de cisteínas conservadas del receptor. En contraste, la activación inicial de la sGC se logra mediante la coordinación por parte del NO del grupo hemo en el sitio activo de la enzima. Uno de los principales objetivos de esta tesis es contribuir en el conocimiento de los componentes moleculares participantes de la cascada de transducción de señales fóticas, lo cual permite establecer blancos para nuevos fármacos capaces de modular Fernando Martín Baidanoff - 2017 8 la sincronización del reloj (cronobióticos). Con este objetivo, se han empleado diversos compuestos, evaluando sus efectos sobre los cambios de fase inducidos por pulsos de luz, o en protocolos de resincronización al ciclo LO (jet lag), analizando también su efecto a nivel del reloj central molecular. El capítulo 1 consiste en la evaluación de las propiedades cronobióticas de un dador novedoso de NO gaseoso [radical (●NO)], N-nitroso-melatonina (NOMel). La administración periférica de NOMel potenció los adelantos de fase inducidos por luz en animales en OO y aceleró la tasa de resincronización en modelos de jet lag (cambios del ciclo de LO), sin tener efecto sobre la vía de los retrasos. A nivel del reloj central, se demostró que esta potenciación fótica induce una mayor expresión de la proteína reloj PERIOD1 (PER1) en los NSQ. Los efectos de este dador exógeno de NO, se mantuvieron al inhibir la síntesis de novo de NO por co-administración central de LNAME. La medición de los metabolitos del NO (nitritos y nitratos) en homogenatos de NSQ luego de la administración

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

de NOMel permite corroborar la función de dador de ●NO a nivel central de esta droga, y descartar un efecto de biodistribución diferencial en la administración en la noche temprana vs. tardía. En contraste con lo anteriormente publicado por nuestro grupo con S-nitroso-acetilpenicilamida (SNAP), NOMel sólo potenció la vía de los adelantos, es decir, la vía dependiente de cGMP y del ●NO como mensajero extracelular. En el capítulo 2, se estudió por administraciones i.c.v. (intra-cerebro-ventriculares) la capacidad cronobiótica del agente antioxidante N-acetil-L-cisteína (LNAC) y de otros dadores nitrérgicos con distinta tiofilicidad y capacidad oxidativa: Sal de Angeli (SA) un dador de nitroxil (NO-), y GSNO, un dador de ●NO y trans-S-nitrosilador. El agente antioxidante LNAC atenuó tanto los adelantos como los retrasos de fase inducidos por luz, probablemente su descripto accionar como agente des-S-nitrosilador y/o scavenger de NO/GSNO podría estar interviniendo en ambas cascadas de transducción de señales. Por el contrario, GSNO potenció tanto los adelantos como los retrasos de fases inducidos por luz. Sin embargo, SA mostro potenciar exclusivamente los adelantos de fase. De esta manera, GSNO se asemeja al ya descripto accionar de SNAP, promoviendo tanto la apertura del RyRII (por S-nitrosilación) como la activación de sGC Fernando Martín Baidanoff - 2017 9 (por ●NO). Por el contrario, la SA se comportó como NOMel, potenciando solamente la vía de adelantos dependiente de ●NO. Una diferencia importante observada entre los dadores de ●NO y el de NO- , fue la inducción farmacológica de cambios de fase per se. Es decir, animales que no recibieron un pulso de luz, mostraron retrasos de fase cuando recibieron SA, en contraste con NOMel, GSNO e incluso SNAP, los cuales no inducen cambios de fase por si solos. Los retrasos de fase per se también fueron observados por la administración i.c.v. del antioxidante LNAC. A saber, en los últimos años se ha puesto en evidencia ritmos circadianos en diferentes componentes del estado redox, íntimamente relacionado con el estado metabólico del organismo. La medición del par redox glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en homogenatos de NSQ de hámsters realizada en este trabajo, permitió confirmar que el propio reloj central presenta un aumento del estado oxidado en la noche subjetiva tardía de este compuesto. Se hipotetiza entonces que la inyección i.c.v. de LNAC al comienzo de la actividad generaría un retraso en el ritmo circadiano redox, retrasando así toda la maquinaria del reloj. Si bien aún no comprendemos cuál es el mecanismo, ensayos preliminares por inmunohistoquímica muestran la inducción de PER1 en neuronas de los NSQ por tratamiento con LNAC, como correlato de la posible acción antioxidante de la droga en el ajuste del reloj molecular central. Finalmente, el capítulo 3 se focaliza en establecer si el estado redox podría modular el reloj circadiano molecular a nivel post-traduccional, a través de oxidaciones por Snitrosilación en proteínas reloj. Mediante ensayos in vitro (células HEK transfectadas con pCMV Sport2 mPer2) y utilizando la técnica de biotin-switch, hallamos Snitrosilaciones en PER2. A su vez, tanto para PER2 como para BMAL1 (otra proteína reloj) se corroboraron modificaciones post-traduccionales por oxidación de cisteínas que afectan su comportamiento in vitro por generación de homodímeros y

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

agregados. Ensayos preliminares in vivo corroboran la presencia de homodímeros de BMAL1 en muestras de cerebro de ratón. Estos ensayos permiten suponer una regulación redox sobre la propia dinámica del reloj molecular. Se adjunta además un ANEXO con el análisis in sílico de la secuencia aminoacídica y de la estructura de PER2, que permite Fernando Martín Baidanoff - 2017 10 arribar a cisteínas candidatas alojadas en los dominios PAS (Per-Arnt-Sim) de homo y heterodimerización, los cuales son claves para el funcionamiento del reloj molecular. Para finalizar, se propone un modelo que relaciona los cambios en el estado redox con la CRF fótica: el hecho de que exista un estado redox que oscila, le permitiría al reloj central, frente a un mismo estímulo, disparar diferentes cascadas de transducción de señales. Es decir, la bifurcación que ocurre a nivel de la nNOS podría deberse a cambios redox-dependientes de la actividad de la nNOS. Frente a un estado reducido (es decir, GSH>GSSG) se hace viable una cascada de trans-S-nitrosilación, debido a que el producto más probable de la actividad de la enzima es GSNO; en cambio en un estado más oxidado (GSH <GSSG) la vía utilizaría al NO como mensajero gaseoso.

Se propone entonces un análisis de la CRF desde un punto crítico del estado redox, en la que la región de retrasos coincidiría con un estado reducido, y la de adelantos con un estado oxidado. La bifurcación entre atrasar o adelantar el reloj, ocurre en un punto crítico del estado redox neuronal, que se traduce en vías de transducción de señales diferentes, siendo la vía que se active la más favorable en el estado y lugar (e.g. localización intracelular) en el que se encuentra.

Finalmente, si bien a lo largo de esta tesis se ha hecho foco en el mecanismo subyacente a la activación de la nNOS, debe comprenderse que el sistema circadiano es parte de la fisiología de los organismos. Por lo tanto, ha de comprenderse también que virtualmente toda enzima, receptor, o canal iónico, podría ser regulado tanto por el sistema redox como el circadiano, posicionando al oscilador redox como un posible sincronizador endógeno acoplado al oscilador molecular.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

MODULACIÓN DE LA SINCRONIZACIÓN FÓTICA DEL RELOJ CIRCADIANO EN MAMÍFEROS

Autor: Lic. Baidanoff, Fernando M.

Director: Dr. Chiesa, Juan J.

Laboratorio de Cronobiología

Departamento de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes

2017

Tesis para optar al título de

Doctor en Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 11

I. INTRODUCCIÓN GENERAL: 12

II. RITMOS CIRCADIANOS 12

II.A. El estudio del tiempo en biología 12

II.B. Características de los ritmos 14

II.C. El Sistema Circadiano 17

III. SINCRONIZACIÓN DEL RELOJ CIRCADIANO 19

III.A. Vía de entrada al reloj 23

III.B. El reloj central: Los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos. 26

III.C. Vías eferentes del reloj 27

IV. MECANISMOS MOLECULARES DE OSCILACIÓN DEL RELOJ 30

IV.A. Oscilaciones citosólicas. 35

IV.B. Vías de señalización involucradas en la sincronización fótica 37

IV.C. Ritmos redox 42

IV.D. Interacción entre el TTFL y el estado redox 46

CAPITULO 1. 51

CARACTERIZACIÓN DE LA N-NITROSOMELATONINA COMO UN CRONOBIÓTICO 51

INTRODUCCIÓN 52

HIPÓTESIS 53

OBJETIVOS. 53

MATERIALES Y MÉTODOS 54

RESULTADOS 60

DISCUSIÓN 72

CAPITULO 2. 77

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD CRONOBIÓTICA DE OTROS DADORES NITRÉRGICOS CON CARACTERÍSTICAS DE S-NITROSOTIOLES. MODULACIÓN FÓTICA REDOX. 77

INTRODUCCIÓN. 78

La Óxido Nítrico Sintasa 78

El nitroxil (NO^-) como un posible mensajero fótico. 82

Modulación del óxido nítrico sobre la sincronización fótica. 83

Modulación del estado redox sobre la sincronización fótica. 84

HIPÓTESIS. 85

OBJETIVOS. 85
MATERIALES Y MÉTODOS 86
RESULTADOS 89
DISCUSIÓN 97
CAPITULO 3. 102
DETERMINACIÓN DE MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES REDOX-DEPENDIENTES EN PROTEÍNAS DEL RELOJ MOLECULAR. 102
INTRODUCCION 103
Descripción estructural del reloj molecular circadiano. 103
OBJETIVOS. 108
MATERIALES Y MÉTODOS 109
RESULTADOS 113
DISCUSIÓN 128
ANEXO. 131
PER2 131
BMAL1 145
DISCUSIÓN GENERAL 149
BIBLIOGRAFÍA 158

A mi familia, amigos y amor…

GLOSARIO:

●NO	óxido nítrico radical
3V	tercer ventrículo
bHLH	dominio básico hélice giro hélice (del inglés, *basic Helix Loop Helix*)
ccg	gen controlado por el reloj (del inglés, c*lock controlled gen*)
cGMP	guanosin monofosfáto cíclico
CRF	curva de respuesta de fase
CT	hora circadiana (del inglés *Circadian Time*)
CysNO	S-nitrosocisteína
DM	dorso medial
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial
GSH	glutatión reducido
GSNO	S-nitrosoglutatión
GSSG	glutatión oxidado
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
LNAC	N-acetil-L-cisteína
LO	ciclo de luz:oscuridad
nNOS	óxido nítrico sintasa neuronal
NO	óxido nítrico
NO^-	nitroxil
NOMel	N-nitrosomelatonina
NSQ	núcleos supraquiasmáticos (reloj central)
OO	oscuridad constante
PAS	dominio Period, Arnt, Sim
PL	pulsos de luz (PLs, plural)
QO	quiasma óptico
RyRII	receptor de rianodina tipo II
SA	Sal de Angeli (dador de nitroxil)
sGC	guanilato ciclasa soluble
SNAP	S-nitrosoacetilpenicilamina
TRH	tracto retino hipotalámico
VL	ventro lateral
ZT	hora dada por el ciclo de luz:oscuridad (del inglés, *Zeitgeber Time*)
i.c.v.	Admnisitración intra cerebro ventricular

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN GENERAL:

La luz es la principal fuente de energía del universo y es, sin lugar a dudas, el estímulo más importante para la vida. De hecho, un factor crucial para el salto evolutivo que permitió la generación de la diversidad de especies, fue justamente la aparición de un sistema que permitiese transformar la energía lumínica en energía química, la fotosíntesis, con la consecuente liberación de oxígeno por parte de organismos fotosintéticos. El nicho oxigénico resultante dio lugar a la evolución de organismos aeróbicos, quienes oxidando compuestos orgánicos obtuvieron la energía necesaria para la vida. Sin embargo, este estímulo lumínico tan crucial para la cadena trófica de nuestro planeta, no se encuentra disponible las 24 h del día. El movimiento de rotación de la tierra sobre su propio eje genera una alternancia entre dos condiciones lumínicas, la noche y el día; un fenómeno que ha estado presente desde antes del origen de la vida. Tal ha sido la importancia de este ciclo de luz/oscuridad (LO) para la evolución de los organismos, que el sistema que permitió el ajuste temporal de la fisiología y el comportamiento con este ambiente oscilante, resultó un carácter positivo seleccionado tempranamente y mantenido a lo largo de la evolución. Es así que los organismos generan variaciones de 24 h en sus procesos biológicos a lo largo del día, denominadas ritmos circadianos.

II. RITMOS CIRCADIANOS

II.A. El estudio del tiempo en biología

Existen observaciones muy antiguas que dan cuenta no sólo de cómo y dónde ocurren determinados procesos en los seres humanos, sino también de *cuándo* ocurren. Así, a mediados del siglo pasado una nueva rama de la ciencia se abrió camino en la biología, aquella que estudia la relación entre los seres vivos y su entorno temporal: la cronobiología (cuyo prefijo "*chronos*" proviene del griego, ´tiempo´).

Si bien la historia de la cronobiología es reciente, las observaciones de comportamientos cíclicos en la naturaleza tienen larga data. Un relato de la mitología

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

griega cuenta la historia de una ninfa llamada *Clythie* quien enamorada del dios sol *Febo* seguía su trayectoria por el firmamento; frente al desprecio de su amor y ya muerta, los dioses del olimpo se apiadan de ella y la convierten en una flor, el girasol. A su vez, Androsthenes, en su campaña al Oriente bajo la orden de Carlo Magno en el siglo IV a.C., relató que las hojas del árbol de tamarindo se movían "como siguiendo al sol". Estos relatos son ejemplos de lo que hoy en día denominamos ritmos "exógenos", los cuales son estrictamente dependientes de claves ambientales externas (la luz solar). Fue recién en el año 1729 que se realizó el primer experimento clave en la historia de la cronobiología (ver Tabla 1). El astrónomo francés Jean-Jacques Dortous de Mairan, observó que las hojas de la planta *Mimosa pudica* se abrían durante el día y se cerraban en la noche. Su experimento se basó entonces en determinar si dicho fenómeno persistía aún en ausencia de variaciones en la luz solar. Para ello, colocó la planta en un armario de modo de mantenerla en condiciones de oscuridad constante y observó el movimiento de las hojas durante el día y la noche. Para su sorpresa, la planta respondía de igual manera, respetando el ritmo de apertura/cierre de las hojas aún en ausencia del ciclo de LO. Así fue como se obtuvo la primera evidencia de un ritmo "endógeno", es decir, aquel que no depende de ninguna variable externa. Sin embargo, el carácter endógeno de este ritmo fue comprobado mucho tiempo después, cuando otras variables, tales como como la temperatura, el campo magnético y la rotación terrestre fueron efectivamente descartadas.

TABLA 1. Breve historia del tiempo biológico. Hitos históricos de la cronobiología (para referencias y explicación detallada ver [1]).

1729	Publicación de Jacques d'Ortous de Mairan sobre el movimiento de las hojas de Mimosa en oscuridad constante.
1751	Carl Linnaeus presenta su "reloj de flores" en su *Philosophia botanica*, para estimar el momento del día de acuerdo al momento de apertura y cierre de flores en el campo.
1759	Du Monceau demuestra que el ritmo del movimiento de las hojas es independiente de fluctuaciones en la temperatura.
1832	Augustine De Candolle reporta la presencia de un período circadiano (22 h) en el movimiento de las hojas.
1880	Charles Darwin publica "*The power of movement in plants*," incluye un análisis del "sueño de las hojas".
1920s 1930s	Estudios a cargo de E. Bünning sobre la heredabilidad de los ritmos circadianos.
1920s	Descripción de ritmos circadianos endógenos en la rata (C. Richter).
1950s	Propiedades formales de ritmos biológicos (C. Pittendrigh).
1959	Franz Halberg acuña el nombre "circadiano".
1960	Primer Cold Spring Harbor Symposium sobre Relojes biológicos (C. Pittendrigh y J. Aschoff).
1960s	Análisis de ritmos circadianos en humanos bajo aislamiento temporal (J. Aschoff).
1968	Descripción completa del reloj biológico en la glándula pineal aviar (M. Menaker).
1971	Descubrimiento de la mutación per en *Drosophila* (R. Konopka, S. Benzer).
1972	Rol de los núcleos supraquiasmáticos en la ritmicidad circadiana (I. Zucker, R. Moore).
1976	C. Pittendrigh and S. Daan publican varios trabajos sobre las bases experimentales y formales en ritmos circadianos en roedores.
1984	Clonado del gen per en *Drosophila*.
1988	Descubrimiento de la mutación tau en hámster.
1990s	Descripción del modelo de retroalimentación negativa de transcripción-traducción del reloj circadiano en varias especies, clonado y genes reloj.
1994	Creación del ratón mutante para clock.
1998–2000	Descubrimiento de las bases celulares y fisiológicas de la fotorecepción no-visual en mamíferos; descripción de relojes periféricos circadianos.
2000	Clonado de la mutación tau en hámster.
2000s	Transcriptoma circadiano.

II.B. Características de los ritmos

Resulta importante en este momento introducir una descripción de cuáles son los parámetros para el estudio o caracterización de un ritmo diario o circadiano en alguna variable biológica (Fig. 1). El *período* (τ, tau), es el tiempo que tarda la variable en completar un ciclo. La *fase* (ϕ), corresponde al momento del ritmo en el que la variable adquiere un valor determinado. Se puede tomar como valor de referencia, o marcador de fase, cualquier punto del ritmo (el máximo -como en el caso de la Fig. 1-, el mínimo, etc.). Estos dos parámetros pueden ser definidos en términos generales, independientemente del método de análisis utilizado para obtenerlos. Por otro lado,

puede realizarse un ajuste por mínimos cuadrados del error de la variable a una función cosenoidal, para obtener: el MESOR (*midline estimating statistic of rhythm*, M), que se define como el valor medio ajustado que toma la variable periódica; y la *amplitud* (A), que es definida como la diferencia entre el valor máximo y M, Si bien todos estos parámetros son claves para describir o comparar a los ritmos e inferir cambios en la actividad del reloj, cabe destacar que el parámetro más importante cuantificado en esta tesis fue la fase (y secundariamente el período), debido a que los cambios en esta variable son esenciales para estudiar la sincronización circadiana. En la Figura 1 se muestran: (B.) dos ritmos que poseen diferente período ($\tau 1 > \tau 2$); (C.) dos ritmos de igual período, pero diferentes amplitudes (A1>A2); y (D.) un mismo ritmo que debido a alguna intervención sufrió un cambio o diferencia de fase (ϕi-ϕj). En el ejemplo, al ocurrir la fase $\phi 2$ con posterioridad a la $\phi 1$, se habla de un retraso de fase. Es fácil deducir entonces cuándo se habla de un adelanto de fase (donde $\phi 2$ ocurre antes que $\phi 1$). Por definición los retrasos de fase se cuantifican con valores negativos, mientras que los adelantos con valores positivos.

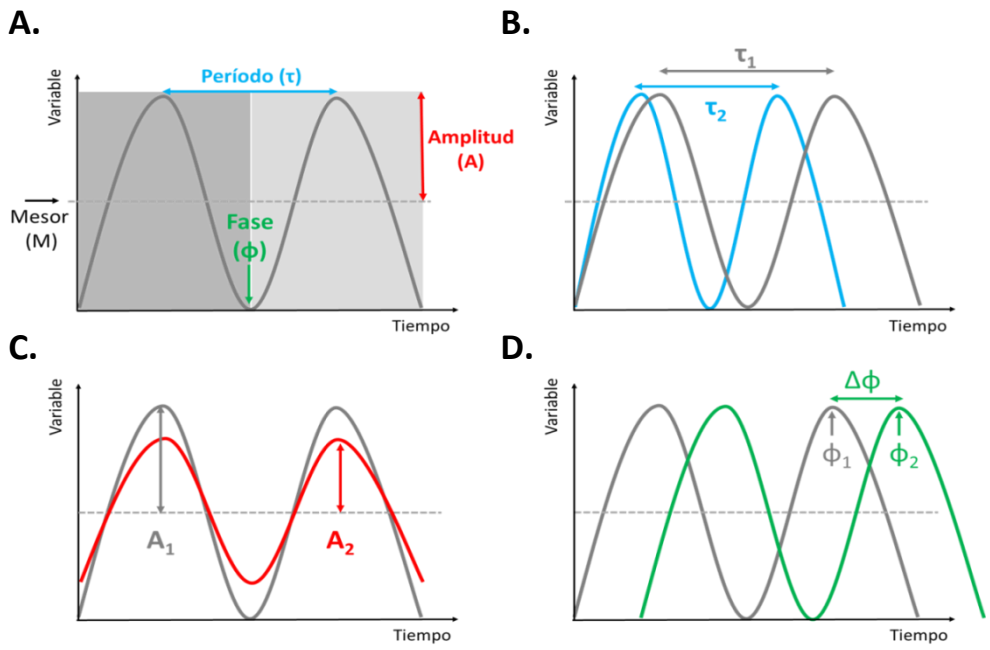


Figura 1. Parámetros característicos de un ritmo. A. Representación de la oscilación de una variable rítmica a lo largo del tiempo, en este caso durante 2 ciclos (señalados en distintas tonalidades de gris). El Período (τ), la Amplitud (A), el MESOR (M) y la Fase (ϕ) son los parámetros que definen a un ritmo. **B.** Diferencia de Período (τ). En la figura se muestran dos ritmos con distintos períodos ($\tau 1 > \tau 2$). **C.**

Diferencia de Amplitud. En la figura se muestran dos ritmos con diferentes amplitud, pero igual período. **D.** Diferencia y cambio de fase (Δϕ). Las dos curvas muestran dos ritmos que tienen fases diferentes (ϕ1 y ϕ2), aunque podría ser el mismo ritmo que debido a alguna intervención en el ciclo previo (ϕ1), modificó su fase en el ciclo siguiente (ϕ2). La diferencia entre estas dos fases (ϕ1 – ϕ2) es lo que denominamos cambio de fase (Δϕ). En este caso, el marcador de fase utilizado es el máximo de la variable, y se trata de un retraso de fase.

Para obtener buenos parámetros estadísticos de los ritmos, se necesita muestrear en una secuencia temporal la variable biológica durante varios días. En los estudios cronobiológicos con modelos animales como los roedores, se utiliza el registro de alguna variable comportamental como la actividad locomotora en rueda. Las series temporales obtenidas con una frecuencia de muestreo definida, se representan en un gráfico llamado actograma (Fig. 2).

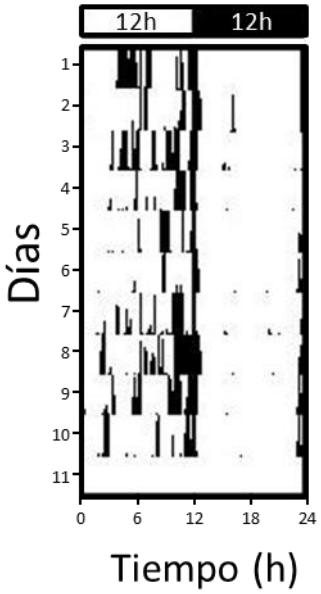


Figura 2. Actograma. Este gráfico se construye ordenando verticalmente en el eje de las ordenadas el registro de la variable circadiana en los días sucesivos, y las horas del día en el eje de las abscisas. Se muestra el registro de eventos de actividad locomotora (número de vueltas en la rueda/5 min), representada con una barra negra vertical. En este caso, se trata de un animal diurno mantenido en un ciclo de LO 12:12 (la barra superior blanca indica las horas de luz, la negra de oscuridad).

Ciertos procesos biológicos pueden ocurrir en escalas periódicas muy diferentes. Franz Halberg clasificó estas periodicidades por su frecuencia, la cual se define como la inversa del período ($f=1/\tau$). Los ritmos *infradianos* (aquellos que tienen un período mayor a 24h, y por lo tanto, una frecuencia menor a 1/24), los *circadianos* (cercano a 24h) y los *ultradianos* (período menor a 24h, frecuencia mayor a 1/24). En la naturaleza existen ejemplos para cada uno de estos ritmos; además, todos ellos

ocurren simultáneamente en un mismo organismo. Por ejemplo, en humanos, el ritmo cardíaco tiene un período de segundos, mientras, que la temperatura corporal oscila cada 24 horas, y el ciclo menstrual tarda 28 días en completarse. En la Tabla 2, se enumeran algunos ejemplos para cada tipo de ritmo.

TABLA 2. Rangos de períodos de los ritmos biológicos.

TIPO DE RITMO	PERÍODO	EJEMPLOS
Ultradiano	0,1 seg.	Electroencefalograma
	1 seg.	Ritmo cardíaco
	6 seg.	Ritmo respiratorio
	60 min.	Secreciones hormonales
Circadiano	24 horas	Actividad/reposo
		Temperatura corporal
Infradiano	28 días	Ciclo menstrual
	365 días	Hibernación

II.C. El Sistema Circadiano

Como se aclaró anteriormente, un hito fundamental en la historia de la cronobiología fue el experimento de aislamiento de la planta *Mimosa*. El hecho de que el ritmo de apertura y cierre de las hojas continuara aún en ausencia de claves temporales exógenas (condiciones constantes), supone indirectamente que tal comportamiento se sostiene por un oscilador (o reloj) interno. He aquí, una de las principales propiedades de los ritmos circadianos: su carácter endógeno [2].

Gracias al estudio llevado a cabo en la década de 1960 por J. Aschoff y R. Wever, se determinó que los ritmos de temperatura y de actividad/reposo en humanos bajo condiciones de aislamiento absoluto, presentaban un período de aproximadamente 25 h [3]. Es decir, el ritmo endógeno en ausencia de claves temporales, diverge del día ambiental en aproximadamente 1 h. Por este motivo, se infiere otra de las propiedades fundamentales de los ritmos circadianos: su capacidad para ser sincronizados.

En 1960, Colin Pittendrigh definió una serie de propiedades que deben presentar los relojes circadianos [4]. Además de su carácter endógeno y de su capacidad para ser sincronizados, deben ser prácticamente independientes de la temperatura, compensando su variación [4]. Como en los procesos bioquímicos y metabólicos, la dependencia de la temperatura de un ritmo biológico normalmente se estudia analizando el valor de Q_{10}, estimando en cuánto varía el período frente a cambios en la temperatura. Si $Q_{10}=1$, el proceso no depende de la temperatura. Los ritmos circadianos tienen períodos con un Q_{10} cercano a 1, lo que permite mantener oscilaciones adecuadas de período estable en los días tanto "fríos" como "calurosos" que ocurren en latitudes septentrionales a lo largo del año.

Por lo tanto, un reloj circadiano debe cumplir tres propiedades fundamentales:

1. Permanecer oscilando en ausencia de claves temporales externas.
2. Sincronizarse al ciclo ambiental en forma estable.
3. Presentar compensación por temperatura.

El sistema circadiano posee tres componentes principales (Fig. 3): (i) una vía de entrada del ciclo sincronizador o *zeitgeber* (del alemán *zeit*, tiempo, y *geber*, dador); (ii) un oscilador, formado por estructuras marcapasos que generan la salida circadiana; y (iii) vías eferentes que acoplan la salida del oscilador a los sistemas efectores [5-7]. Sin embargo, el sistema no debe ser considerado lineal, ya que lo efectores pueden afectar al oscilador (en un proceso de retroalimentación que permitiría una sintonía fina del mismo); y/o también existe la posibilidad de que el *zeitgeber* afecte directamente a la salida rítmica, en un proceso conocido como enmascaramiento [8].

En los protocolos cronobiológicos de laboratorio, el ciclo de LO es administrado como *zeitgeber* considerando distintos parámetros: su período T, establecido en 24 h en condiciones normales para la mayoría de los organismos, su *fotoperíodo* (o fotofase) y su *escotoperíodo* (escotofase), que son respectivamente la cantidad de horas de luz y de oscuridad, los cuales se definen por la especie [en rata y ratón, ambos son de 12 h (ciclo LO 12:12)], mientras que en el hámster se utiliza un fotoperíodo de 14 h (LO 14:10). Otro parámetro es la intensidad de la luz administrada, la cual se define como

el área bajo la curva del fotoperíodo [tiempo de iluminación, y cantidad de luxes (unidad de intensidad de luz en el Sistema Internacional)].

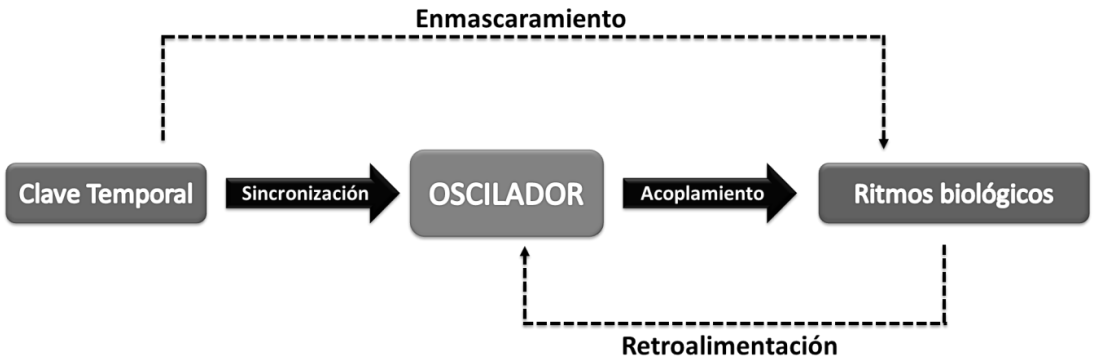


Figura 3. Principales componentes del Sistema Circadiano. El Sistema se compone de un oscilador central que genera los ritmos; un componente exógeno o clave temporal sincronizadora *–zeitgeber-*; y, un componente de salida, que son los ritmos biológicos. Se representan además, el proceso de enmascaramiento, dónde el *zeitgeber* afecta directamente al ritmo; y el de retroalimentación, dónde los ritmos pueden modular al oscilador central.

III. SINCRONIZACIÓN DEL RELOJ CIRCADIANO

Para que ocurra la sincronización, el período endógeno τ debe hacerse igual al período T del ciclo LO. Para ello, la diferencia τ - T debe ser anulada por el efecto sistemático de la luz sobre el reloj. Experimentalmente se han construido dos modelos de sincronización, teniendo en cuenta si el estímulo fótico se presenta de manera continua, o discreta:

1- *Modelo paramétrico*: este modelo considera que la luz, al ser administrada de manera continua (p. ej., el fotoperíodo completo del ciclo LO), ejerce sus efectos directamente sobre el período endógeno (de modo que: $\tau \rightarrow \tau^{*} = T$). Este modelo fue sostenido principalmente por Jürgen Aschoff, debido a sus observaciones sobre la dependencia de τ en condiciones de luz constante, respecto de la intensidad lumínica [9].

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

2- *Modelo no-paramétrico*: este modelo, impulsado por Colin Pittendrigh, considera que el efecto sincronizador de la luz sobre el reloj es discreto, dado que él observó que era posible sincronizar el ritmo de actividad locomotora por fotoperíodos breves (o pulsos) de luz de no más de 1 hora por ciclo (e.g., un ciclo LO 1:23, denominado *fotoperíodo esqueleto*). En este caso, el pulso de luz modifica la fase del reloj [de modo que: $\Delta\varphi = \tau - T$ [10]]. Es decir, para Pittendrigh lo que importaba eran las transiciones fóticas del ciclo LO (Fig. 4), que en condiciones naturales conforman los crepúsculos, los cuales son ecofisiológicamente relevantes en roedores nocturnos como el hámster.

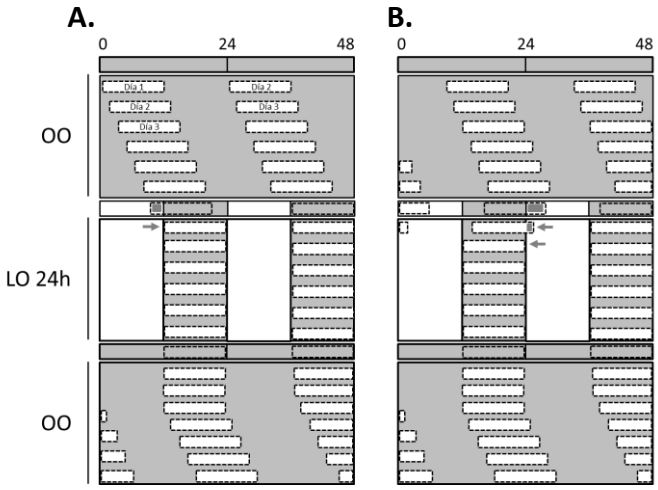


Figura 4. Sincronización circadiana. Se muestran actogramas de doble ploteo esquemático, en donde cada fila corresponde a dos días consecutivos, la barra blanca horizontal punteada corresponde a la distribución diaria de la actividad locomotora de un animal. En el ejemplo, el período endógeno (τ) en condiciones de oscuridad constante (OO) es menor a 24h; sin embargo, cuando se coloca al animal en un ciclo de luz:oscuridad de 24h (LO 24h) la luz incide en el inicio (**A.**) o en el final (**B.**) de la actividad, generando retrasos o adelantos de fase respectivamente hasta sincronizar el ritmo circadiano locomotor con el ciclo LO.

Actualmente se considera un modelo sintético de sincronización, que incorpora tanto los efectos continuos como los discretos del ciclo LO sobre el reloj [11, 12].

En la Figura 5 se observa que, en condiciones de LO bajo un T de 24 h, el animal está sincronizado y su actividad comienza siempre a la misma hora (el momento en el que se apagan las luces, convencionalmente llamado *zeitgeber time* 12 o ZT 12) y, por lo tanto, su período es de 24 h. En condiciones constantes, sin embargo, el período

endógeno de los hámsters es un poco mayor a 24 h. Dada la ausencia de señales ambientales, el animal mantiene sus ritmos según la hora que le indica su reloj biológico, la cual se define como *hora circadiana* (*circadian time*, CT, con una duración de τ/24 h, subdividiendo τ desde CT0 a CT24). Considerando el ritmo de actividad/reposo, se define al *día subjetivo* como la fracción del período circadiano correspondiente al "día" exógeno, que para un animal nocturno coincide con su fase de reposo de CT0 a CT12 (por definición, CT12 es el inicio de la actividad). En cambio la *noche subjetiva*, cuando el reloj indica que debería ser de noche, el roedor está activo desde CT12 a CT24.

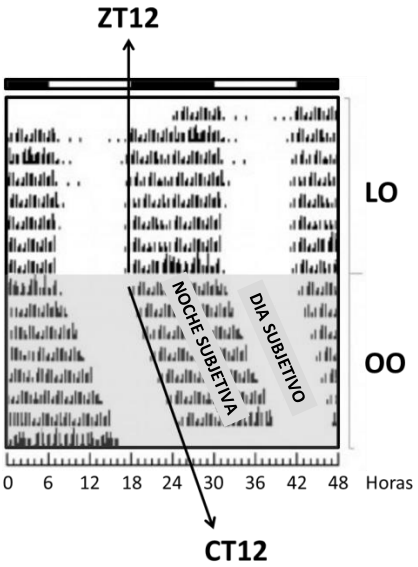


Figura 5. Registro de actividad locomotra en actograma doble. Se muestra un actograma de gráfico doble del registro de actividad locomotora en rueda de un roedor nocturno bajo condiciones de LO 12:12. El animal se encuentra sincronizado al ciclo LO, y se define como *Zeitgeber Time* (ZT) 12 al momento del apagado de las luces. En cambio, bajo condiciones de OO, el ritmo entra en libre curso, se evidencia su período endógeno, y se define el inicio de la actividad como *Circadian Time* (CT) 12. Siendo un animal nocturno, la fase de actividad corresponde con la noche subjetiva, por el contrario durante el día subjetivo el animal se encuentra en reposo.

Como se mencionó, el *zeitgeber* más importante para el reloj central es el ciclo de LO. Para que ocurra la sincronización fótica, el reloj debe responder diferencialmente a la luz a lo largo del día. Desde un punto de vista no-paramétrico, el pulso de luz debe modificar la fase del reloj circadiano, hasta que el período del ciclo subjetivo interno se corresponda con el del ciclo externo de LO [13]. Durante el día subjetivo, la luz prácticamente no tiene efecto sobre la fase del reloj. Durante la noche subjetiva, la luz tiene dos efectos "crepusculares" diferentes: en la noche temprana (unas dos horas circadianas luego del inicio de la actividad en OO, CT14), el estímulo fótico genera retrasos de fase; en la noche tardía (unas seis horas circadianas luego del inicio de la actividad, CT18), la luz produce adelantos de fase. De esta manera se conforma una

curva de respuesta de fase (CRF) para la luz, representada con una línea continua en la Figura 6 [13]. Toda otra clave temporal que sincronice al reloj independientemente del efecto lumínico, cae comúnmente en una clasificación colectiva de "estímulos no-fóticos", dentro de los cuales se encuentran la actividad física, la activación experimental de la vigilia (en inglés*, arousal*), interacciones y hábitos sociales, entre otros. Más allá de su naturaleza, estos estímulos se consideran como no-fóticos debido a que producen su efecto si son administrados durante el día subjetivo, configurando una CRF no-fótica (línea discontinua, Fig. 6).

La forma precisa de una CRF fase depende no solo del tipo de especie (por ejemplo, los ratones no suelen tener grandes adelantos de fase) sino también de la historia previa de cada animal (cantidad de días en oscuridad constante antes del pulso de luz) y de las condiciones del estímulo lumínico (duración del pulso e intensidad de la luz). Las CRFs para animales diurnos tienen características similares a aquellas para animales nocturnos. Efectivamente, los animales diurnos también tienen retrasos de fase en la noche temprana, adelantos en la noche tardía, y poco o ningún efecto de la luz durante el día. Esta similitud refleja el hecho de que el mismo reloj circadiano genera los ritmos en organismos diurnos y nocturnos, aunque la fase de actividad esté invertida respecto al ciclo LO. Cabe destacar que las estructuras que controlan el nicho temporal de los organismos, son aún desconocidas (para una revisión sobre el tema, ver [14]).

Vale la pena resaltar que los retrasos inducidos por luz en la noche temprana, o avances en la noche tardía, son suficientes para explicar la sincronización circadiana al ciclo de LO. Si el reloj tiene un período mayor a 24 h (Fig. 4.A.), la región sensible a adelantos de la CRF recibirá mayormente el estímulo lumínico, induciendo adelantos diarios que mantienen en fase el ritmo comportamental con el ciclo LO, promoviendo la sincronización estacionaria (*entrainment*) al ciclo LO (τ=T). Por el contario, si el período fuera menor que 24 h, la región sensible a retrasos será estimulada por la luz, y estos retrasos diarios promoverán la sincronización con el ciclo LO. De este modo, la diferencia τ-T determina una relación de fase estacionaria entre el reloj y el ciclo LO, denominada *ángulo de fase*. Además, la relación entre el período y la amplitud de la

CRF, es un estimador de los límites de *entrainment* de un reloj circadiano, siendo: τ + (+ $\Delta\varphi$) , el límite superior, y τ + (- $\Delta\varphi$), el límite inferior.

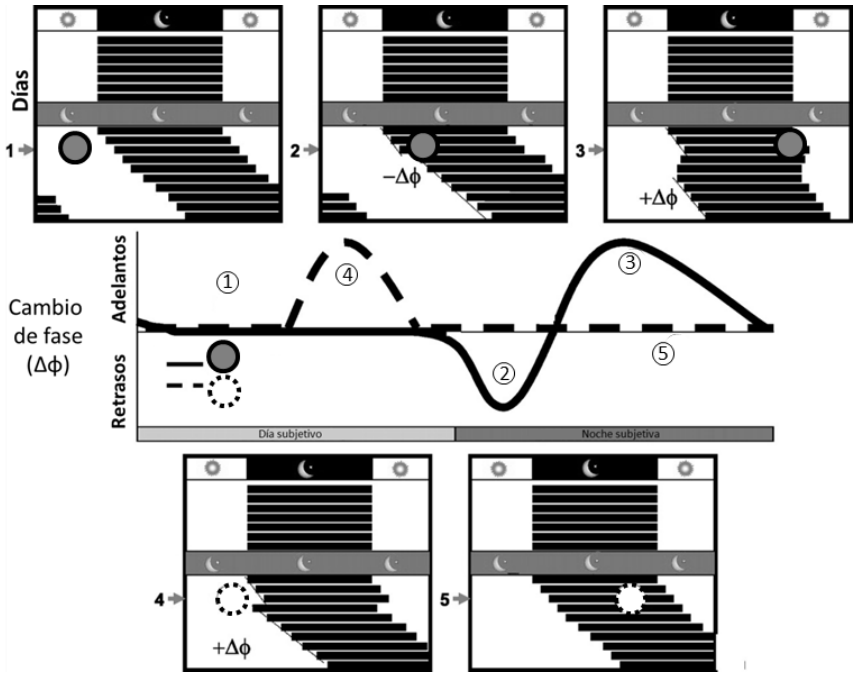


Figura 6. Curvas de respuesta de fase de los ritmos circadianos. En los paneles superiores, los actogramas representan la respuesta del ritmo de actividad locomotora a la luz (simbolizado con un círculo relleno con línea contínua) durante 1) el día subjetivo (sin modificar la fase); 2) en la noche temprana (generando un retraso de fases) y 3) en la noche tardía (produciendo un adelanto de fase). En los paneles inferiores se representan actogramas mostrando la respuesta a pulsos "no-fóticos" (tal como la presentación de una nueva rueda al animal, indicado con un círculo vacío con líneas punteadas) dados: 4) durante el día subjetivo (induciendo adelantos de fase), o 5) durante la noche subjetiva (ningún cambio es generado). En el gráfico central se representa ambas curvas de fases, CRF a luz (líneas sólidas) y CRF a estímulos no fóticos (línea punteada), se indican los números de las manipulaciones realizadas en los correspondientes actogramas. Por convención, los adelantos de fase son graficados con valores positivos, mientras que los retrasos son negativos. Las CRF fóticas son por lo general bifásicas, con retrasos de fase al comienzo de la noche subjetiva y adelantos en la noche tardía. La forma y la amplitud de las curvas son específicas de la especie. Además, la amplitud de la CRF es proporcional a la intensidad del estímulo lumínico [Figura modificada de [13]].

III.A. Vía de entrada al reloj

El sistema circadiano en los mamíferos percibe la luz a través de un sistema fotorreceptor especializado en la retina, que proyecta aferencias no-visuales hacia

distintas regiones del cerebro, principalmente el hipotálamo. Sin embargo, en otros vertebrados como los peces, anfibios, reptiles y las aves, el sistema fotorreceptor que sincroniza al sistema circadiano se encuentra en el cerebro en la glándula pineal, la cual recibe la luz directamente a través del cráneo.

En los mamíferos, la luz incide en la región ganglionar de la retina, cuyas neuronas envían una gran cantidad de proyecciones axonales por el tracto retino-hipotalámico (TRH) de los nervios ópticos hacia la región supraquiasmática del hipotálamo (donde se cruzan los nervios ópticos formando un quiasma), y donde se hallan los núcleos supraquiasmáticos (NSQ), sitio del reloj circadiano central (Fig. 7).

La mayor parte de las células de la capa ganglionar de la retina, expresan el fotopigmento melanopsina, siendo intrínsecamente fotosensibles [ipRGCs, del inglés *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells* (von Schantz, Provencio et al. 2000, Gooley, Lu et al. 2001, Berson, Dunn et al. 2002, Hattar, Liao et al. 2002, Provencio, Rollag et al. 2002, Muscat, Huberman et al. 2003)], dando origen al TRH del nervio óptico. El TRH proyecta desde la retina hacia los NSQ [15, 16] y a una treintena de otras regiones cerebrales, de las cuales algunas retro-proyectan a los NSQ. De esta manera es evidente que existe una gran variedad de circuitos por los cuales la información lumínica podría indirectamente influir sobre la función de los NSQ (para una revisión actualizada del tema, ver [17]).

El principal *input* fótico hacia los NSQ proveniente del TRH utiliza los neurotransmisores glutamato [18, 19], aspartato, Péptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pitutaria (PACAP, por sus siglas en inglés), y la sustancia P [20-23]. La vía que transmite los estímulos circadianos no-fóticos incluye proyecciones talámicas aferentes desde la hojuela intergeniculada lateral (IGL), que utiliza como neurotransmisores al neuropéptido Y (NPY) y al ácido γ-aminobutírico (GABA [24], para una revisión actualizada ver [25]), junto a proyecciones serotoninérgicas desde el rafe (5-HT) [26]. A su vez, tanto la histamina [27] como la acetilcolina [28-30] han demostrado también modular la señal fótica.

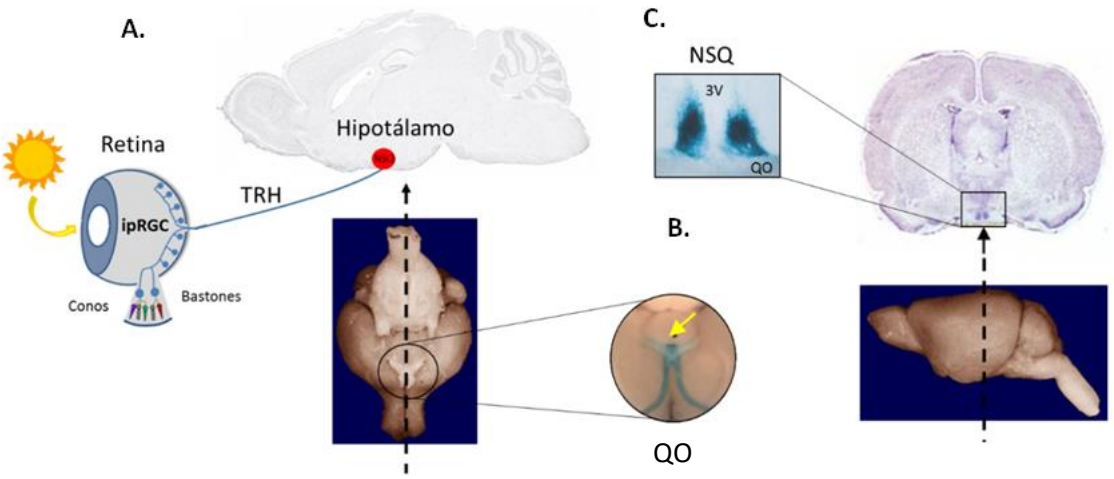


Figura 7. Localización anatómica y aferencia principal de la transmisión lumínica de los núcleos supraquiasmáticos. Las células ganglionares retinianas intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs) detectan la luz que afecta al sistema circadiano, gracias a su detección directa vía el fotopigmento característico que expresa –melanopsina- e, indirectamente, a través de conos y bastones. Las proyecciones de estas células ganglionares (B. en azul, actividad de la enzima β-galactosidasa clonada en el locus del gen de melanopsina) se dirigen por el tracto retino-hipotalámico (TRH) de los nervios ópticos hacia el quiasma óptico (QO, sitio de conjunción de los nervios, indicado con una flecha amarilla) inervando a los Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ). Con fondo azul, se muestran fotografías de cerebros de ratón, indicando corte sagital (izquierda) o coronal (derecha), para indicar la localización anatómica de los NSQ. A modo de resumen, se observa en **A.** un esquema simplificado de la inervación directa desde el ojo hasta los NSQ vía el TRH. Finalmente en **C.** se observan cómo las proyecciones provenientes de las células ganglionares (gal+) inervan a los NSQ. 3V: tercer ventrículo; QO: quiasma óptico.

Varias investigaciones independientes sugieren que el glutamato es la principal señal fótica para el reloj circadiano, dado que: i) es liberado luego de la estimulación eléctrica del TRH, su aplicación *in vivo* induce cambios de fase que se asemejan a los causados por luz, y el bloqueo de receptores de glutamato en los NSQ inhibe el cambio de fase inducido por luz; ii) se han descripto diferentes receptores glutamatérgicos en los NSQ, incluyendo los del tipo metabotrópico, y los ionótropicos NMDA (*N*-methyl-D-aspartate receptor) y AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor); y iii) algunas subunidades del receptor NMDA exhiben cambios circadianos en los NSQ [18, 31-39]. En la Figura 8 se resume las aferencias hacia los NSQ.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

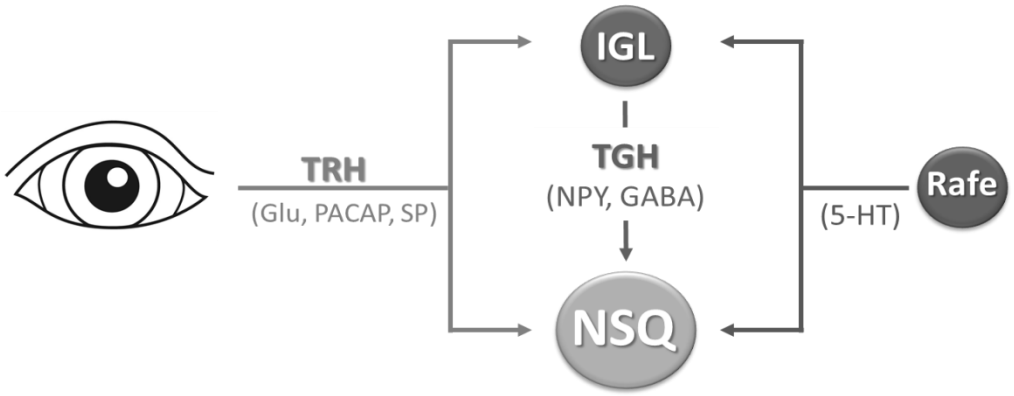


Figura 8. Núcleos Supraquiasmáticos. Las aferencias retinianas provenientes de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs), llegan a los Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ) a través del Tracto Retino-Hipotalámico (TRH) utilizan al glutamato (Glu), al Péptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pitutaria (PACAP) y Sustancia P (SP) como neurotransmisores. A su vez, el TRH inerva la hojuela Intergeniculada Lateral del Tálamo (IGL), quien a su vez retro-proyecta a los NSQ vía el Tracto Genículo-Hipotalámico (TGH) usando Neuropéptido Y (NPY) y ácido γ-aminobutírico (GABA), que junto ala vía serotoninérgica (5-HT) del rafe media los estímulos no-fóticos.

III.B. El reloj central: Los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos.

El componente principal del reloj biológico en los mamíferos son los núcleos supraquiasmáticos, dos grupos de células nerviosas que se encuentran bilateralmente en la parte anterior del hipotálamo en la base del tercer ventrículo y sobre el quiasma óptico (Fig. 9). La ablación de dichos núcleos provoca la desaparición de los ritmos circadianos de secreción hormonal, liberación de neurotransmisores, actividad locomotora, temperatura, entre otros [40-43]. Más aún, trasplantes de tejido hipotalámico neonatal conteniendo los NSQ en animales lesionados, restauran los ritmos circadianos de estos últimos, induciendo la ritmicidad fenotípica del donante en el receptor [44-46].

Si bien los experimentos anteriores consideraban a los NSQ como una unidad funcional, actualmente se sabe que son altamente complejos y heterogéneos, considerando no solo sus características neuroquímicas (Figura 9.A) sino también sus vías aferentes y eferentes (Fig. 9.B) [47-49]. En base a estas características es posible identificar dos subregiones, una dorso-medial (DM) (en inglés, core), y una ventro-lateral (VL) o shell [50]. A su vez, la organización topográfica de estos grupos

específicos de neuronas, sugiere una división funcional de las áreas de los NSQ [51]. La región VL está localizada inmediatamente por encima del quiasma óptico, presenta neuronas que sintetizan polipéptido vasoactivo intestinal (VIP, por sus siglas en inglés), péptido liberador de gastrina (GRP), péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP) [52], y calbindina en el hámster [53]. Circundando la región VL se halla la región DM, cuyas neuronas expresan arginina-vasopresina (AVP) y calretinina (CALR) [54-56]. Los NSQ-VL reciben la mayoría de las aferencias de la retina y en menor medida de la vía indirecta; mientras que se considera que el input principal que recibe la región DM proviene de la región VL, recibiendo aferencias de otras partes del hipotálamo, áreas límbicas y de la vía indirecta. A pesar de que el área DM es considerada un poderoso oscilador autónomo [57], su robustez y su oscilación neuronal sincronizada depende en gran medida de la liberación neuropeptidérgica de la región VL [58-62].

III.C. Vías eferentes del reloj

El reloj central controla los ritmos fisiológicos y comportamentales a través de moléculas difusibles producidas por las neuronas de los NSQ [63-65], y de sus proyecciones directas e indirectas hacia otras regiones del cerebro y del encéfalo. En particular, se han identificado cuatro eferencias que parten desde los NSQ en el cerebro del ratón. Tres de ellas están confinadas dentro del hipotálamo medial (Fig. 10.A.) y son: las neuronas endócrinas que producen hormonas liberadora de corticotropina (CRH), liberadoras de tirotropina (TRH) y liberadora de gonadotropina (GnRH); las neuronas paraventriculares autonómicas (aPVN); y las neuronas intermedias. Las neuronas intermedias a su vez, incluyen las neuronas de los núcleos sub-paraventriculares del hipotalámo (sPVN), las neuronas de los núcleos dorso-mediales del hipotálamo (DMH) y las neuronas de los núcleos preópticos mediales (MPN). Por fuera del hipotálamo, las proyecciones neuronales de los NSQ llegan a los núcelos paraventriculares del tálamo (PVT) y a la IGL [66].

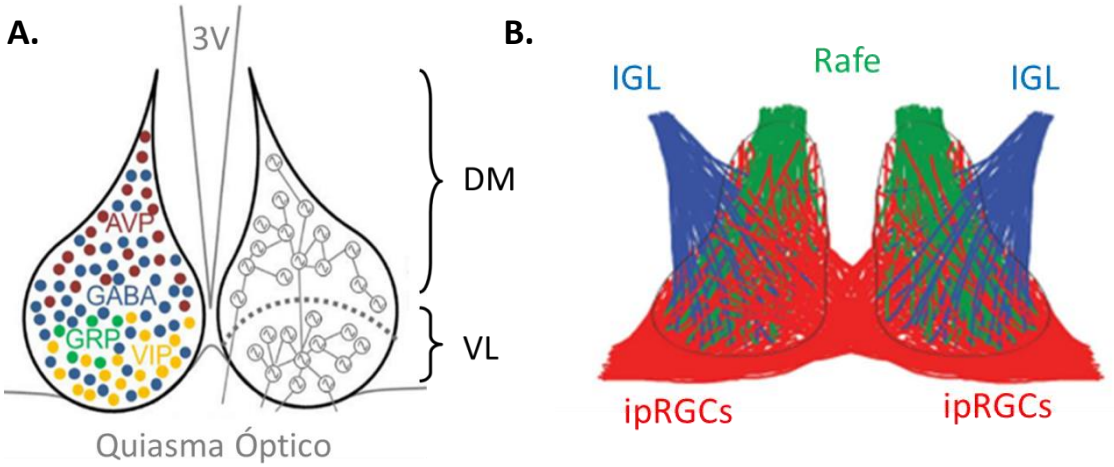


Figura 9. Subdivisiones de los Núcleos Supraquiasmáticos. **A.** Regionalización neuroquímica de los NSQ y división ventrolateral (VL) / dorsomedial (DM). La disposición de las células caracterizadas neuroquímicamente es especie-dependiente. 3V, tercer ventrículo. **B.** Esquema que representa las aferencias de los NSQ. ipRGCs, células ganglionares intrínsecamente fotosensibles; IGL, hojuela intergeniculada lateral del tálamo. Figuras adaptadas de [67, 68].

En los roedores, el reloj central controla el ritmo circadiano en la producción de corticosterona plasmática a través de la vía neuroendócrina y del sistema nervioso autónomo. Los NSQ controlan la actividad del sistema nervioso autónomo a través de sus proyecciones dirigidas hacia las neuronas de los núcleos paraventriculares anteriores (aPVN), núcleo que se comunica a su vez, vía neuronas preganglionares parasimpáticas y simpáticas, con el tronco cerebral, en particular con el núcleo motor dorsal del vago (DMV) y con las columnas de células intermediolaterales [(IML) Fig. 10.B. [69]]. Los NSQ controlan indirectamente la secreción de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) liberada por la glándula pitutaria, a través de las neuronas endócrinas productoras de CRH en el hipotálamo [70]. Variaciones circadianas en la actividad del sistema nervioso autónomo y en la producción de ACTH, resultan en la liberación rítmica de corticoesterona de la glándula adrenal al sistema circulatorio. De esta manera se pone en evidencia un *output* del reloj, la oscilación circadiana en los niveles de corticosterona plasmática, con una clara influencia sobre el metabolismo y sobre los sistemas reguladores del estrés del organismo.

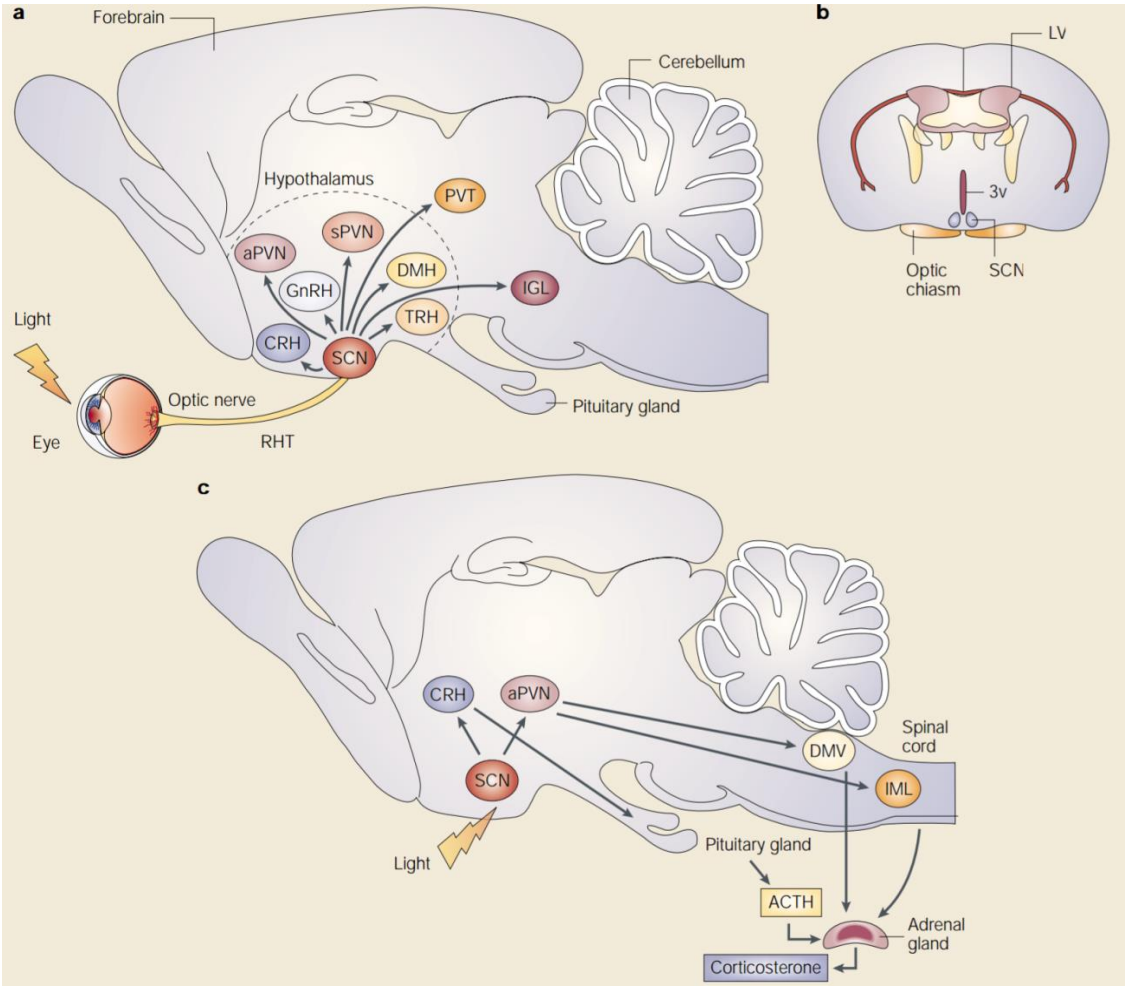


Figura 10. Vías eferentes del reloj central. A. Diagrama evidenciando el control del reloj central, los NSQ, sobre las neuronas neuroendócrinas productoras de hormonas liberadoras de corticotropina y núcleos neuronales tanto dentro como por fuera del hipotálamo. **B.** Control neuroendocrino y por vías del sistema nervioso autónomo sobre la liberación de corticosterona por parte de la glándula renal. Figura modificada de [71].

Los NSQ modulan además la secreción pineal de la hormona melatonina a través de la inhibición GABAérgica del PVN, evitando la activación simpática del ganglio cervical superior (SCG) vía la columna intermediolateral de la espina dorsal (ILC). El rol de la melatonina sobre la sincronización de los ritmos está bien documentada (Fig. 11), liberándose a plasma exclusivamente durante la fase nocturna y su uso esta incluso indicada para el tratamiento de diferentes afecciones circadianas en humanos [72].

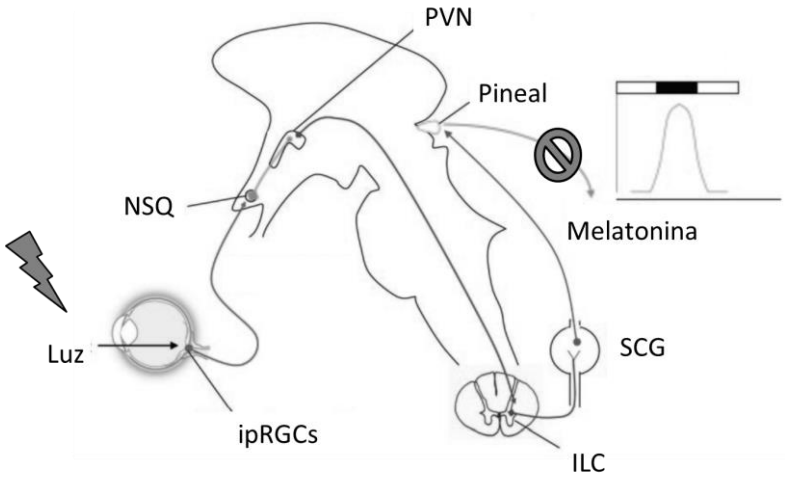


Figura 11. Inhibición por luz de la secreción de melatonina durante la noche subjetiva. La luz detectada por las células retineanas ganglionares intrínsicamente fotosensibles (ipRGCs) generan la inhibición de los núcleos paraventriculares (PVN) por la liberación de GABA por parte de los núcleos supraquiasmáticos. De esta manera se controla la liberación simpática de melatonina a través la columna intermediolateral de la espina dorsal (ILC) y el ganglio cervical superior (SCG). Figura modificada de [73]

IV. MECANISMOS MOLECULARES DE OSCILACIÓN DEL RELOJ

El reloj molecular está compuesto por tres sistemas de expresión genética acoplados: (a) un elemento negativo, (b) un elemento positivo y (c) un sistema de genes controlados por el reloj (CCG, del inglés *clock controlled gen*), que participan en la regulación de los ritmos celulares. Los elementos negativos y positivos están formados por los llamados "genes reloj", cuyos productos proteicos generan un patrón de oscilaciones mediante su expresión cíclica. Esta oscilación se encuentre profusamente regulada, tanto a nivel transcripcional, como traduccional y post-traduccional [74, 75]. El sistema básico de oscilación consta de un ciclo de retroalimentación negativa en el que un componente positivo promueve la síntesis de un componente negativo que, al acumularse, reprime su propia síntesis, y cuya degradación posterior permite el reinicio de un nuevo ciclo. Este modelo recibe el nombre de bucle de retroalimentación de transcripción y traducción - TTFL por sus siglas en inglés, *trascriptional-translational feedback loop*- (Fig. 12).

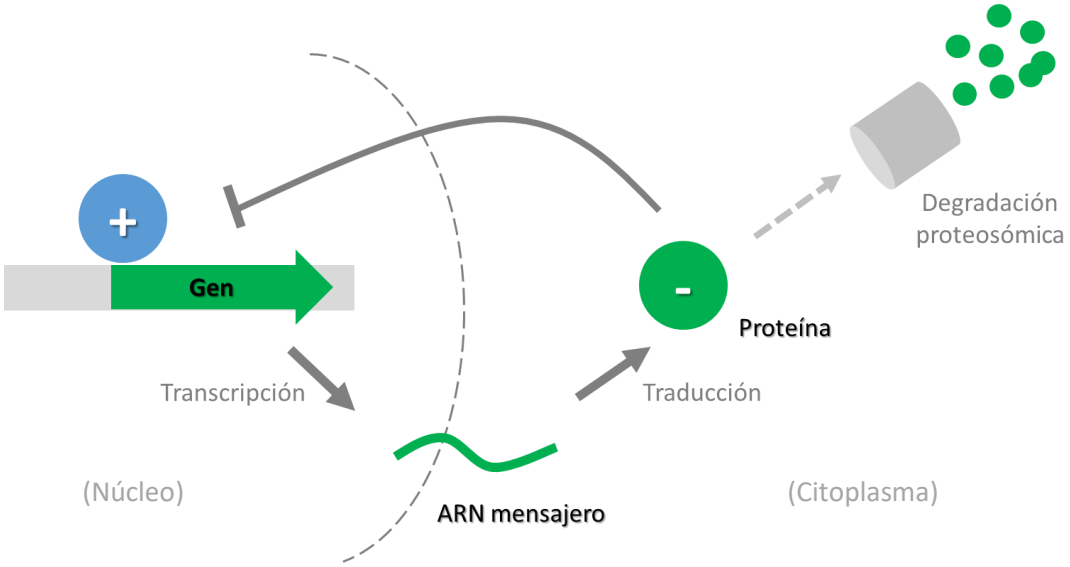


Figura 12. Modelo básico del reloj molecular: bucle de retroalimentación negativa transcripcional y traduccional. El TTFL (por sus siglas en inglés *transcriptional-translational feedback loop*) se sustenta por la auto-inhibición que un elemento negativo genera sobre su propia síntesis. La transcripción del gen del elemento negativo (flecha verde) genera la acumulación del ARN mensajero, cuya exportación al citoplasma permite su traducción a proteína. El elemento proteico negativo (círculo verde) reingresa al núcleo inhibiendo la transcripción de su propio gen. Finalmente, la degradación del elemento negativo, retira la inhibición y permite al elemento positivo (círculo celeste) dar inicio a un nuevo ciclo de TTFL.

El mecanismo del reloj molecular en mamíferos es actualmente entendido como un circuito transcripcional de retroalimentación que involucra a muchos genes. Los genes Clock (del inglés *Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*) y Bmal1 (del inglés *Brain and muscle ARNT-like protein*) codifican proteínas con dominios bHLH-PAS (del inglés, *basic-helix-loop-helix* y *Per-Arnt-Single-minded*, su nombre se debe a las primeras proteínas caracterizadas con éste dominio), que forman la rama (o *loop*) **positiva** del circuito de retroalimentación. El heterodímero CLOCK:BMAL1 inicia la transcripción por unión a elementos específicos del DNA, los E-boxes (5´ -CACGTG- 3') y E´-boxes (5´-CACGTT- 3´), en las regiones promotoras de los genes objetivo [76, 77]. Este conjunto de genes activados incluyen miembros del *loop* **negativo** del circuito de retroalimentación, incluyendo a los genes Period (Per1 y Per2) y Cryptochrome (Cry1 y Cry2) [78, 79]. Las resultantes proteínas PER y CRY dimerizan e inhiben la actividad

transcripcional de CLOCK:BMAL1, permitiendo que el ciclo se repita desde un nivel bajo de actividad transcripcional [80-84].

La remodelación de la cromatina, necesaria para que la actividad transcripcional cíclica progrese, resulta de la combinación de proteínas específicas del reloj con proteínas modificadoras de histonas, fenómeno observado en la acetilación/deacetilación rítmica de histonas (H3 y H4) sobre múltiples genes controlados por el reloj [85, 86]. Cabe destacar que CLOCK posee un dominio de histona acetil transferasa (HAT), necesario para el rescate de los ritmos en fibroblastos que expresan una versión mutante de este dominio [87]. El complejo CLOCK:BMAL1 también recluta a la metiltransferasa MLL1 y al inhibidor de la histona deacetilasa JARID1a para facilitar la activación transcripcional [88, 89]. La deacetilación ocurre, en parte, debido al reclutamiento por PER1 del complejo SIN3-HDAC (SIN3- histona deacetilasa) a la región de ADN de unión a CLOCK:BMAL1 [90].

Es importante destacar que la deacetilación rítmica de la histona H3 en la región promotora de los genes circadianos, es regulada por la deacetilasa SIRT1, sensible a los niveles del cofactor Nicotinamida Adenina Dinucléotido (NAD+) [91, 92]. Esto resulta interesante considerando que la proporción en los niveles de [NAD+]:[NADH] ha demostrado regular la capacidad de CLOCK:BMAL1 para unirse al ADN *in vitro* [93]. En consecuencia, el metabolismo celular podría cumplir un rol en la regulación del estado transcripcional y de la actividad del reloj molecular (ver sección *IV.C. Interacción entre el TTFL y ritmos redox*).

La degradación de las proteínas de la rama negativa, PER y CRY, es requerida para terminar con la fase de represión y reiniciar un nuevo ciclo de transcripción. La tasa de estabilidad/degradación de las proteínas PER y CRY es clave entonces para establecer el período del reloj. El primer mamífero identificado como mutante circadiano fue el hámster tau, el cual mostraba un período endógeno de 20 horas de duración, comparado a los controles (*wild-type*) cuyo período es de 24 horas [94]. Este fenotipo de acortamiento del período resultó de la mutación en la enzima casein-quinasa 1 epsilon (CK1ε), una quinasa que fosforila a las proteínas PER [95]. Otra casein-quinasa, CK1δ, también fosforila a las proteínas PER, y estas fosforilaciones mediadas por CK1ε/δ regulan la ubiquitinización de PER por β-TrCP, con la consecuente degradación a

través del proteosoma 26S [96-99]. Otros estudios de mutantes con períodos diferentes al normal, llevó a la identificación de la vía de degradación de las proteínas CRY. En dos ejemplos independientes de mutagénesis química en ratones, se hallaron fenotipos con incrementos de período cuyo posterior análisis molecular permitió aislar al gen Fbxl3 [100-102]. FBXL3 poliubiquitina a las proteínas CRY, marcándolas de esta manera para la degradación proteosomal [102]. Curiosamente, CRY1 y CRY2 son blancos de ubiquitinización por eventos únicos de fosforilación y defosforilación. CRY1 es fosforilada por AMPK1, y CRY2 por una acción secuencial de la cascada DYRK1A/GSK-3 β [103-105].

Los genes parálogos de Per (Per1, Per2 y Per3) y de Cry (Cry1 y Cry2) poseen roles no-redundantes. Tres alelos nulos independientes de Per1 mostraron ratones con períodos menores (entre 0.5 y 1 hora) a los de los *wild-type*; en cambio, la pérdida del gen (*knock out*, KO) Per2 produjo ratones con una reducción de 1.5 horas en su período inicial, aunque pasadas las semanas en condiciones constantes, los animales resultaban arrítmicos [106-109]. Por el contrario, mientras estudios en ratones mutantes para Per3 sugieren que este gen no es crítico para la regulación de los ritmos circadianos [108, 110], ciertos polimorfismos en Per3 se encuentran fuertemente asociado al cronotipo en humanos [111]. Los alelos KO para los parálogos de Cry tienen efectos opuestos. Los ratones Cry1-/- tienen un período una hora menor que los controles, mientras que los Cry2-/- una hora mayor [112-114]. A nivel molecular, la pérdida de un alelo puede ser en algunos casos parcialmente compensada con el incremento de su parálogo. Por ejemplo, en los KO de Per1 y Cry1 existe un incremento en Per2 y Cry2, respectivamente [115]. Sin embargo, tanto la reducción como la pérdida de Per2 o Cry2 no producen efectos compensatorios. Características tales como las descriptas dan información sobre las diferencias observadas a nivel comportamental de alelos individuales. Tanto a nivel comportamental como molecular, al menos un miembro de cada familia es crítico para lograr la ritmicidad circadiana, ya que ratones Per1-/-; Per2-/-; Cry1-/- y Cry2-/- son arrítmicos [108, 109, 112, 113]. Cabe destacar que algunas alteraciones fenotípicas observadas en el laboratorio en modelos genéticos, son revertidas cuando los animales son estudiados

en condiciones semi-naturales, lo cual demuestra la complejidad de la regulación circadiana y de la presencia de sistemas redundantes [116].

Recientemente se ha logrado obtener el genoma completo de los elementos regulatorios que actúan en *cis* sobre el *loop* transcripcional de CLOCK:BMAL1 [117]. Este estudio ha revelado una regulación circadiana global de la ocupación de los factores de transcripción, el reclutamiento e iniciación por parte de la RNA polimerasa II, la transcripción naciente y el remodelado de la cromatina. Se encontró que el ciclo transcripcional circadiano del reloj consiste de tres fases distintas: un estado suspendido, una activación transcripcional coordinada *de novo*, y un estado de represión. Curiosamente, solo el 22% de los mRNA de los genes que oscilan son dirigidos por esta transcripción *de novo*, sugiriendo que tanto mecanismos transcripcionales como post-transcripcionales gobiernan el funcionamiento del reloj circadiano en mamíferos.

El dímero CLOCK:BMAL1 también inicia la transcripción de un segundo *loop* de retroalimentación que actúa en coordinación con el ya descripto. Éste involucra la transcripción mediada por E-box de los genes del receptor nuclear huérfano Rev-Erb α/β y ROR α/β [118-120]. Las proteínas REV-ERB y ROR compiten entonces por los sitios de unión a RORE (del inglés, *Retinoic acid-related Orphan receptor Response Element*) dentro del promotor de Bmal1: mientras ROR inicia su transcripción, las proteínas REV-ERB la inhiben [118-120]. Este *loop* fue originalmente reconocido como una rama accesoria debido a los fenotipos sutiles observados en ratones con mutaciones individuales en los alelos de estos genes. Mientras que los doble KO son letales durante el desarrollo, los mutantes condicionales han permitido la eliminación de Rev-Erb α y β en animales adultos. La caracterización de estos mutantes ha revelado que los genes Rev-erbs son cruciales para la regulación del período de los ritmos comportamentales [121]. A su vez, un *set* separado de genes PAR bZIP que contienen elementos tipo D-box en sus regiones promotoras, conforma otro potencial *loop* transcripcional. Estos incluyen a genes de la familia HLF [122], DBP [123], TEF [124] y Nfil3 [125]. Si se considera solamente la tasa de transcripción/traducción descripta para los genes Per/Cry, resulta fácil imaginar que toda la oscilación tarda significativamente menos de un día. Se ha propuesto entonces que los tres elementos

de unión conocidos aportan la demora necesaria para que la duración del proceso sea cercano a 24 horas: E-box en la mañana, D-box en el día, y elementos RORE en la tarde [126]. Aunque ningún gen o familia de genes en este *loop* accesorio D-box son requeridos para el funcionamiento del reloj, se especula que podrían servir para generar oscilaciones robustas en los componentes principales, sumando precisión al período [127]. En la Fig. 13 se muestra un esquema actualizado del reloj molecular circadiano.

En los últimos años, nuestro conocimiento sobre el mecanismo del reloj central ha sido extendido más allá del clásico TTFL, para incluir las oscilaciones citosólicas y metabólicas, sobre las cuales se considera que interactúan con el TTFL para mantener el correcto funcionamiento del reloj y el control rítmico de la fisiología celular [128]. El ritmo circadiano en las oscilaciones metabólicas de óxido/reducción -ritmos redox-, se halla altamente conservado en la evolución, y hasta es considerado un reloj celular potencialmente independiente del clásico TTFL [129]. Alternativamente, los productos redox cíclicos podrían actuar en concierto con la maquinara post-transcripcional regulando funciones celulares del reloj, como es el caso de la excitabilidad neuronal en los NSQ [130].

IV.A. Oscilaciones citosólicas.

Se ha demostrado que las oscilaciones citosólicas de Ca2+, cAMP, NAD+/NADH, y glucosa, actúan no solo como simples mediadores en las salidas del reloj, sino que también interactúan con el TTFL, y contribuyen a la homeostasis y amplitud de las oscilaciones celulares [128]. Tal vez, la oscilación citosólica mas estudiada en mamíferos sea la concentración intracelular de Ca2+ ($[Ca2+]_i$). En las neuronas de los NSQ, $[Ca2+]_i$ aumenta durante el día y disminuye durante la noche, un patrón que, al menos en parte, depende de oscilaciones en la activad eléctrica [129-131]. Si bien la entrada de Ca2+ a través de canales de Ca2+ dependientes de voltaje es requerida para el funcionamiento molecular del reloj [132] y para su sincronización [133], es posible que no sea la única fuente para la ritmicidad endógena en la $[Ca2+]_i$. Es probable que las reservas de $[Ca2+]_i$ controladas por IP3Rs (receptores de inositol

1,4,5-trifosfato) y RyRs (receptores de rianodina) en las neuronas de los NSQ [134], sean responsables del incremento inicial en la $[Ca2+]_i$ [131]; sin embargo, el mecanismo preciso que regula la $[Ca2+]_i$ no se encuentra aun totalmente dilucidado.

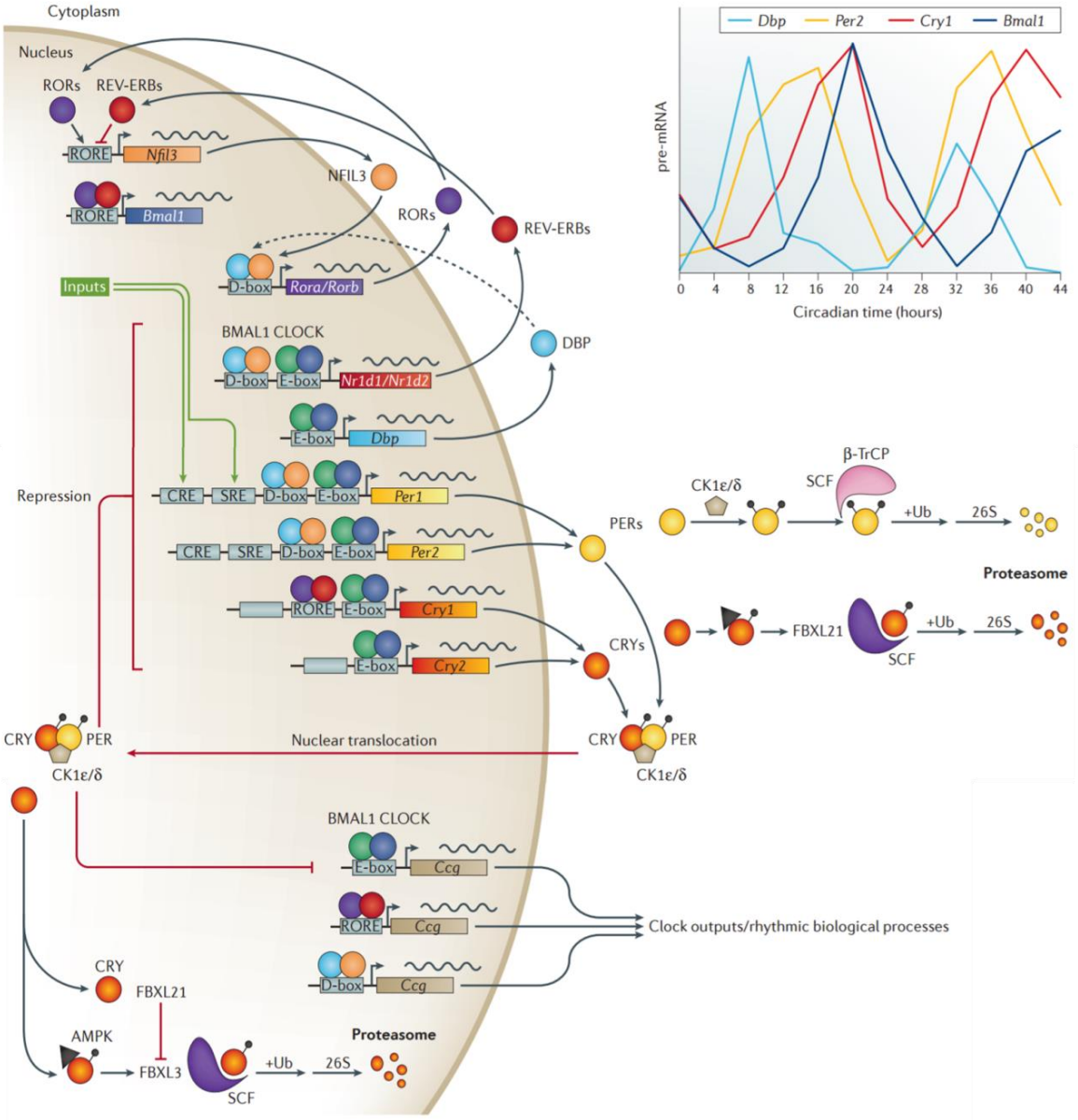


Figura 13. Reloj molecular en mamíferos. CLOCK y BMAL1 actúan como factores de transcripción maestros regulando (i) los componentes negativos del reloj, Per (amarillo) y Cry (naranja); (ii) el *loop* REV-ERB/ROR (rojo/violeta, respectivamente), quien regula la transcripción de Bmal1 (azul), al igual que cientos de genes controlados por el reloj (Ccg - *clock controlled genes*), quienes resultan ser las salidas (*outputs*) moleculares del reloj, controlando rítmicamente los procesos biológicos. La estabilidad de PER y CRY está finamente regulada por la E3 ubitiquin-ligasa tanto a nivel citoplasmático como nuclear, determinando el período de los ritmos. Se muestra el patrón de expresión en hígado de ratón de

algunos genes en la parte superior derecha. Para mas detalle leer cuerpo del texto. [Figura tomada de [135].

Además de su rol central en en la regulación del mecanismo molecular del reloj, el Ca2+ actúa como un segundo mensajero transduciendo la señal iniciada como un cambio en la excitabilidad de la membrana hacia el núcleo celular [136]. Por otro lado, actúa como modulador de las propiedades de la membrana a través de su acción sobre canales dependientes de nucléotidos cíclicos [137]. Por ejemplo, la despolarización glutamatérgica inducida por luz en los NSQ genera un aumento de $[Ca2+]_i$, el cual es requerido para los cambios de fase circadianos. Estos cambios de fase inducidos por glutamato en los NSQ son a su vez reproducidos *in vitro* por la aplicación de agonistas glutamatérgicos, y requieren de la activación de los canales de Ca2+ dependientes de voltaje [138].

IV.B. Vías de señalización involucradas en la sincronización fótica

IV.B.i. Vía del Glutamato, Óxido Nítrico Sintasa, Guanilato Ciclasa y Receptor de Rianodina

Como ya fue mencionado, el glutamato es un neurotransmisor relevante para la sincronización fótica de los ritmos circadianos. Además, existe evidencia de que el glutamato participa como neurotransmisor en vías efectoras hacia otras estructuras hipotalámicas [139]. Si bien su síntesis ocurre tanto en células de la glía como en neuronas, su reciclado está principalmente mediado por el ciclo de glutamato/glutamina en células de la glía [140]. A pesar de que su re-incorporación por parte de estas células no muestra oscilaciones circadianas, la mutación de genes reloj afectan este proceso [141]. En estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando antagonistas específicos para el receptor ionotrópico NMDA, se demostró que la interacción del gutamato con este receptor es necesaria para los cambios de fase fóticos [142-146]. Estos antagonistas también inhiben la expresión inducida por luz del gen c-Fos (un marcador de activación neuronal) y de los genes Per1/Per2 en los NSQ [18, 37, 38, 145, 147]. Por otra parte, la administración i.c.v. de glutamato o de NMDA, imita la CRF fótica [36, 148, 149].

El incremento en la concentración intracelular de Ca2+ por apertura del receptor NMDA media la activación de una familia de proteínas quinasas dependientes de calcio y calmodulina (CaMKs), reguladas tanto por la luz como por el reloj circadiano [150]. Entre sus varias isoformas, CaMKII está presente en los NSQ y, junto con calmodulina, han sido propuestas en la vía de sincronización fótica [151-154]. Por otra parte, la inhibición de CaMKII bloquea la expresión de Per1/2 en los NSQ [155], mientras que su activación induce la expresión de Per *in vitro* [156, 157].

Uno de los mecanismos intracelulares mejor descriptos en la sincronización fótica, comprende la fosforilación de la enzima Óxido Nítrico Sintasa (NOS) por acción de la CaMKII. Basado en estudios farmacológicos, la activación de la NOS es crucial para la sincronización de los ritmos circadianos [158-161]. A su vez, dadores de óxido nítrico (NO) incrementan la respuesta de fase a la luz [159]. Nuestro laboratorio ha comprobado que la nNOS se fosforila por acción de la CaMKII en los NSQ del hámster, y que esta interacción enzimática es necesaria para una normal progresión en los cambios de fase inducidos por luz [150]. Sin embargo, ratones con mutaciones para la versión neuronal o endotelial de la NOS (nNOS y eNOS, respectivamente) no han mostrado diferencias respecto a los controles en términos de su respuesta a la luz, sugiriendo que la compensación por vías redundantes (incluyendo otras isoformas) podría estar involucrada en la respuesta normal de estos mutantes [162, 163].

Un evento específico intracelular que correlaciona exclusivamente con los retrasos de fase inducidos por luz a CT14 (noche temprana), es la liberación de Ca2+ por parte del reservorio intracelular en el retículo endoplasmático a través de los receptores de rianodina (RyR) [164]. A su vez, la expresión circadiana del gen RyR tipo II (RyRII) hallada en neuronas de NSQ de roedores [165] permitió comprobar que el reloj molecular controla el propio input fótico para su sincronización [166]. Por otro lado, dadores de NO promueven la apertura de este receptor [167] modificando la función neuronal en otras estructuras cerebrales [168]. Por el contrario, durante la noche tardía (cuando la luz genera adelantos a CT18), el NO es capaz de activar a la guanilato ciclasa soluble (sGC) en NSQ, con el consecuente incremento en los niveles de cGMP y la eventual activación de la proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG). Los NSQ

expresan la isoforma II de PKG [169-171], y los niveles de cGMP y la actividad de PKG es máxima durante el día o día subjetivo [169, 172]. Todas estas variables se encuentran incrementadas por pulsos de luz administrados durante la noche tardía, pero no durante la noche temprana, generando adelantos de fase. A su vez, la inhibición farmacológica de las vías relacionadas con el cGMP en los NSQ reducen los adelantos inducidos por luz [169, 173, 174]. Por lo tanto, a CT18 la activación fótica de la vía nNOS-sGC-cGMP-PKG está involucrada en los adelantos de fase [169, 172-176], mientras que a CT14, se activa la vía nNOS-RyR-Ca_i involucrada en los retrasos (Fig. 14). La bifuración río debajo de nNOS se debería a la segregación temporal de los sustratos [166]: en contraste con la actividad constante de sGC [172], la expresión rítmica de RyRII la involucra exclusivamente en la via de retrasos [164].

.

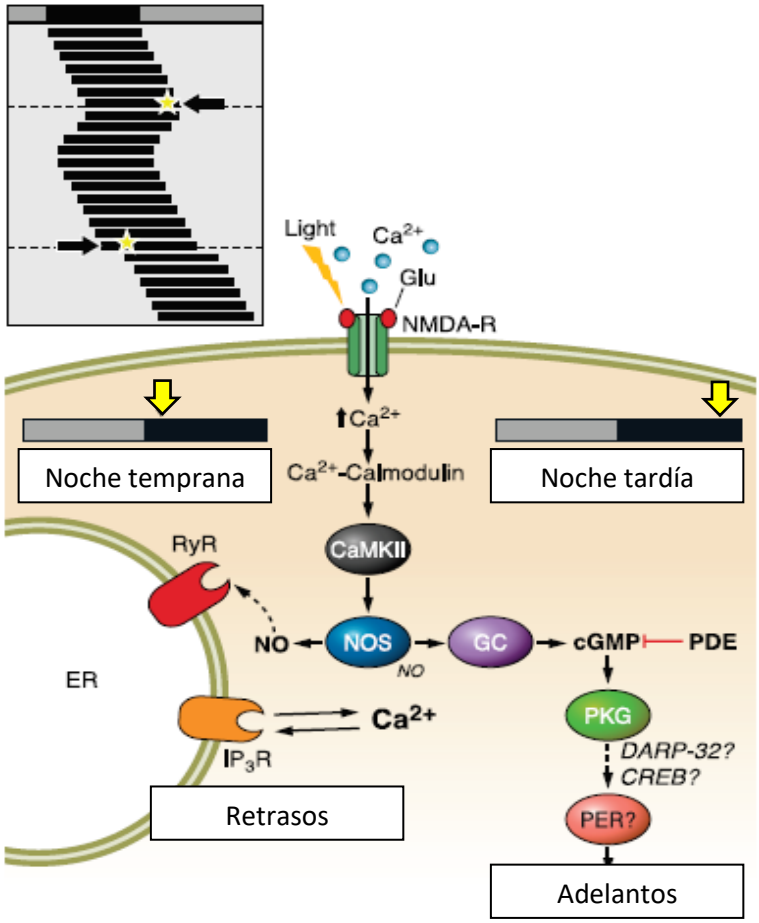


Figura 14. Bifurcación de las vías de transducción de señales para adelantos y retrasos de fases inducidos por luz. Ambas vías poseen en común la sensibilidad a la estimulación por glutamato del tracto retinohipotalámico y su interacción final con genes reloj, vía factores de transcripción específicos (como CREB). En la noche temprana (izquierda), pulsos de luz inducen la liberación de calcio vía

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

receptores de rianodina (RyR)/IP3. Por el contrario, durante la noche tardía (derecha), el óxido nítrico (NO) activa la síntesis de cGMP, produciendo la activación de la proteína dependiente de cGMP (PKG). Manipulaciones farmacológicas en los niveles de cGMP (por ejemplo, la inhibición de la cGMP fofodiesterasa, PDE, incrementando los niveles de cGMP) potencian los cambios de fase inducidos por luz. Los mecanismos río debajo de PKG, que llevan a la activación génica y los cambios de fases comportamentales no han sido aún dilucidado completamente. Figura modificada de [13].

Además, nuestro laboratorio ha comprobado que el NO actúa como un mensajero extracelular en la sincronización fótica. Sin embargo, el rol del NO como un neurotransmisor gaseoso estaría confinado a la vía de adelantos, ya que el secuestro extracelular por inyecciones intracerebroventriculares de PTIO previo a un pulso de luz a CT14 no tuvo efecto, mientras que su administración previo a un pulso de luz a CT18 bloqueó los adelantos de fase del ritmo de actividad locomotora en hámster [177, 178]. En otras palabras, la activación de la NOS por pulsos de luz en la noche tardía generaría NO como mensajero gaseoso promoviendo adelantos, mientras que la activación de la misma enzima en la noche temprana, generaría la apertura del receptor de rianodina, induciendo los retrasos sin la necesidad de una comunicación gaseosa entre neuronas.

IV.B.ii. Otras vías de transducción fótica: MAPKs y PKA

A pesar que la activación de PKA está relacionada con los cambios de fase no fóticos, un efector clásico en la señalización por cAMP es la vía mediada por la familia de las MAPKs. Pulsos de luz activan ERK2 en los NSQ de ratas, mientras que su inhibición *in vivo* bloque la respuesta circadiana a la luz [179-182]. A su vez, se ha comprobado en el hámster que otros miembros de esta familia están involucrados, tales como ERK1/2, p38 y JNK [183]. Algunos componentes de la familia MAPKs son capaces de fosforilar a CREB en los NSQ, estableciéndose su relación con mecanismos de sincronización. A sí mismo, las MAPKs pueden regular la activación de CaMKII [156, 184], indicando una compleja red en la cascada de transducción de señales. Sin embargo, las señales de entrada para la activación de la vía mediada por las MAPKs en los NSQ no se encuentran totalmente dilucidadas

IV.B.iii. El cambio de fase a nivel del oscilador circadiano molecular

Siguiendo la cascada activada por luz, tanto la activación mediada por CaMKII como por otras quinasas generan la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB). La inhibición CaMKII bloquea la fosforilación inducida por luz de CREB [152]. De hecho, la fosforilación de este factor de transcripción y la consecuente inducción en la expresión de Per es uno de los mecanismos involucrados en los cambios de fase inducidos por luz [185-192]. A su vez, CREB puede ser considerado como un elemento común a diferentes vías de sincronización del reloj circadiano [190]. CREB señaliza la transcripción génica a través del elemento de respuesta a cAMP (CRE), y diferentes mecanismos post-transcripcionales convergen en esta regulación: la fosforilación de CREB y la inducción de ICER (represor temprano inducible por cAMP) permite el control transitorio de la expresión génica [193]. En este sentido se ha encontrado que ICER es inducida por pulsos de luz en los NSQ durante la noche subjetiva [194], y se encuentra relacionada con la secreción pineal de la hormona circadiana melatonina [195, 196].

Los miembros del *loop* negativo, en particular las proteínas PER, actúan como el estado variable en el mecanismo molecular circadiano [197]. Resumidamente, esto significa que los niveles de estas proteínas determinan la fase del reloj y, por lo tanto, su capacidad de sincronización con el ciclo de LO. En la noche, cuando los niveles de PER son bajos (Fig. 15), la administración aguda de pulsos de luz causa la inducción transcripcional de Per1 y Per2 [198-200]. A nivel de la salida del reloj, la exposición lumínica en la noche temprana genera retrasos de fase comportamentales, los cuales se correlacionan con un incremento de PER1 y PER2 en los NSQ [201]. En la noche tardía, solo los niveles de PER1 aumentan con la exposición a la luz, generando un adelanto de fase comportamental [201]. Si bien no se conocen los componentes río debajo de las vías dependientes del NO, se postula que en un última instancia deberán converger con la cascadas dependientes de CREB (PKA-cAMP y MAPK) actuando sobre CRE en la región promotora de Per [202].

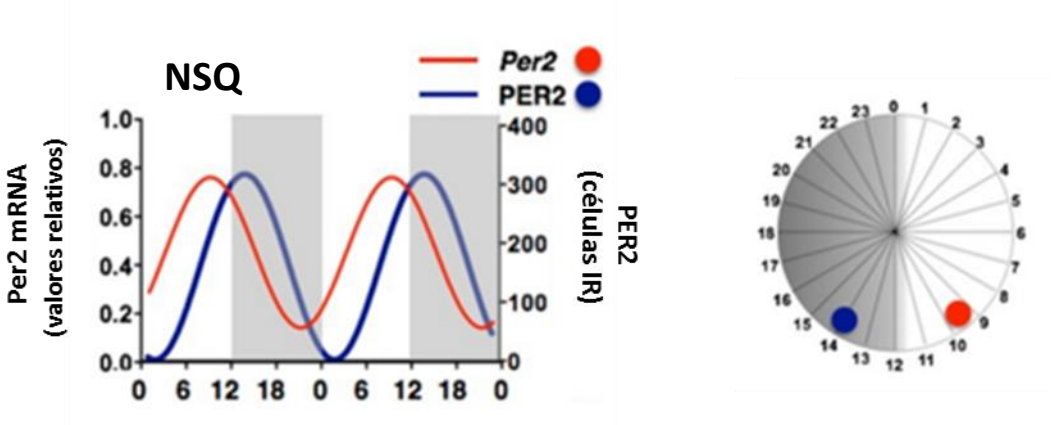


Figura 15. Organización temporal y relación de fase del gen Per2. Se observa en la izquierda la expresión relativa del transcripto (mRNA, en rojo) y de la proteína (azul) en NSQ de ratas a lo largo de dos ciclos de 24 horas. En el gráfico circular de la derecha se muestra la relación de fase entre el máximo de expresión del transcripto y el máximo observado para la proteína. Obsérvese que existe una "demora" de aproximadamente 4 horas entre el mRNA y la proteína. Figura tomada de [203].

IV.C. Ritmos redox

Muchas reacciones bioquímicas son reacciones de óxido-reducción que dependen del estado redox intracelular. En particular, la energía metabólica está íntimamente conectada por la homeostasis redox, debido a que la respiración celular depende principalmente de la oxidación de glucosa para la producción de energía química bajo la forma de ATP. Este proceso utiliza a los co-factores redox NAD+ y FAD para la transferencia electrónica que ocurre en el ciclo de Krebs y en la fosforilación oxidativa. La energía metabólica también provee a la célula de NAD fosfato reducido (NADPH), quien es principalmente utilizado en procesos biosintéticos promoviendo también la homeostasis redox en el citoplasma.

El control en el estado redox celular es esencial para proteger a las células del daño causado por los compuestos oxidados. El estrés oxidativo es caracterizado por una potencial oxidación descontrolada causada por un exceso de poder oxidativo [204]. Los mecanismos antioxidantes se encuentran altamente conservados entre los organismos aeróbicos y se basan principalmente en la eliminación de compuestos reactivos del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*), por glutatión (GSH), tioredoxinas (TRX) y peroxiredoxinas [(PRDX) Fig.16]. Sin embargo, los ROS también funcionan como segundos mensajeros en la transducción de señales implicada en

varios procesos metabólicos [205-208] y en la respuesta celular al estrés oxidativo [209-211]. Incluso se ha extendido el rol de la señalización por ROS en procesos de envejecimiento [212, 213].

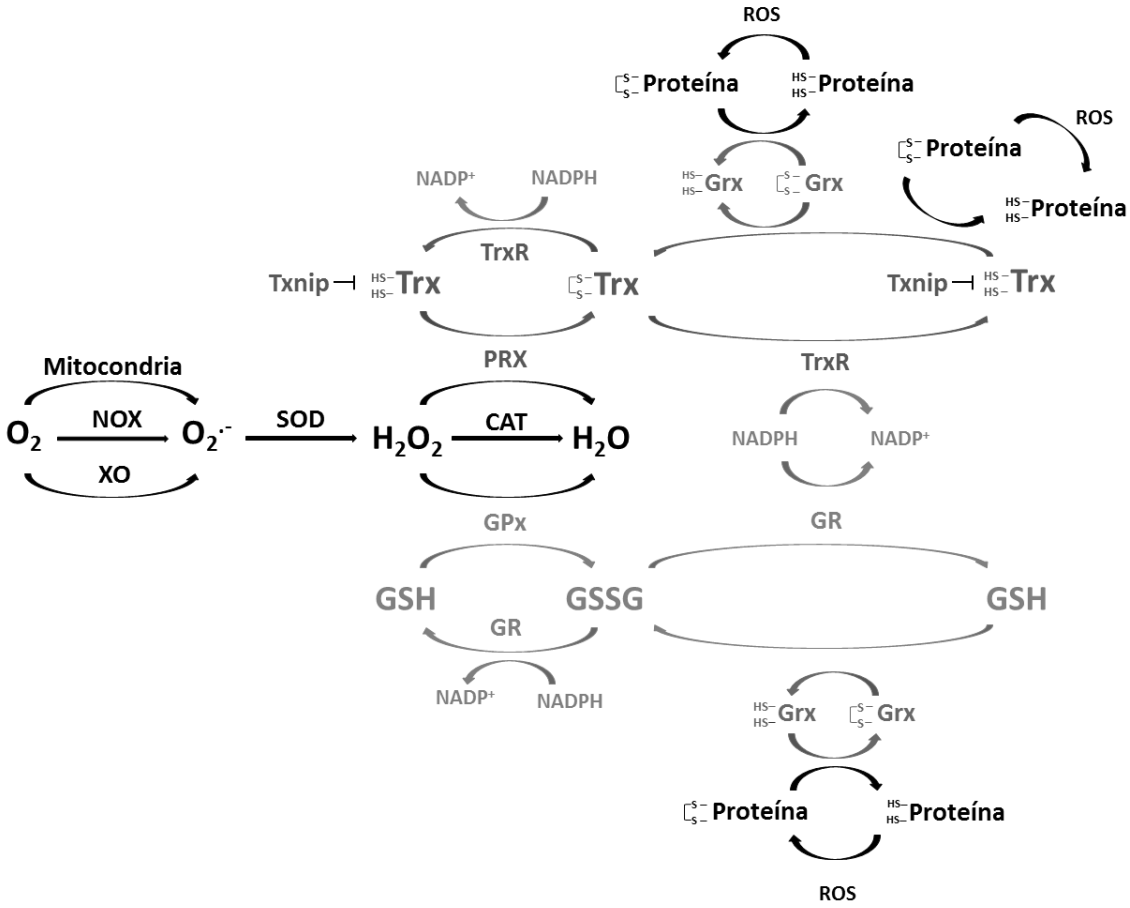


Figura 16. Sistemas enzimáticos que controlan al estado redox celular. El ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es producido tanto en mitocondrias como por acción de las enzimas NADPH oxidasa (NOX) y xantina oxidasa (XO). Este ión es reducido a H_2O a través de una serie de reacciones enzimáticas que involucran a la superóxido dismutasa (SOD) y a la enzima catalasa (CAT). El último paso de la reacción puede también ser catalizado por peroxirredoxinas (PRX) oxidando tiorredoxina (TRX), o por la glutatión peroxidasa (GPx), oxidando al glutatión (GSSG). La oxidación de TRX o GSH es reversible por el sistema acoplado de la tiorredoxina reductasa (TrxR) o la glutatión reductasa (GR), respectivamente, procesos que consumen poder reductor en forma de NADPH. El pool reducido de GSH o Trx permite la regeneración directa o indirecta [vía glutarredoxinas (Grx)] de sustratos proteicos oxidados por especies reactivas del oxígeno (ROS).

Una hipótesis recurrente sobre la aparición de relojes circadianos durante la evolución se centró en la segregación temporal de procesos incompatibles. Este criterio es claramente aplicable a las reacciones redox, donde el potencial redox intracelular

puede direccionar a las reacciones bioquímicas en una u otra dirección. En este sentido, la compartimentalización espacial permite adecuar el ambiente redox a la necesidades específicas de las organelas (oxidación en retículo>citsolo>núcleo [214, 215]). En los mamíferos, se ha propuesto que procesos incompatibles, tal como la síntesis de glucógeno y su degradación, ocurren en fases diferentes del reloj circadiano [216]. Además, las reacciones bioquímicas que generan productos secundarios potencialmente dañinos, pueden ser restringidas a una ventana temporal estrecha de modo de minimizar los efectos negativos sobre otros procesos celulares [217]. El estado redox nuclear es igualmente fundamental para la activación de los factores de transcripción del reloj molecular CLOCK y NPAS2 [93] o REV-ERVβ ([218] ver *IV. D. Interacción entre el TTFL y el estado redox*).

Se han descripto evidencias de separación temporal redox a escala circadiana en una variedad de condiciones experimentales para la mayoría de los pares redox reportados, incluyendo ritmos circadianos en plasma de humanos en la tasa de: NADP+:NADPH, glutatión reducido:glutatión oxidado (GSH:GSSG) y cisteína:cistina (Cys:CySS) [219, 220]. Estas determinaciones junto con la reciente medición circadiana de FAD y NAD(P)H en los NSQ [221], corroboran ritmos redox tanto en periferia como a nivel central.

Las interacciones entre el sistema circadiano y el estado redox han sido estudiadas desde diversos enfoques y en casi todos los organismos modelos de laboratorio (plantas [222], hongos, [222, 223] moscas [224]). La evidencia presentada permite entonces hipotetizar la presencia de una oscilación circadiana redox, que alterna entre un estado oxidado/reducido (Fig. 17), presente tanto a nivel sistémico, orgánico, tisular, celular y subcelular, y molecular.

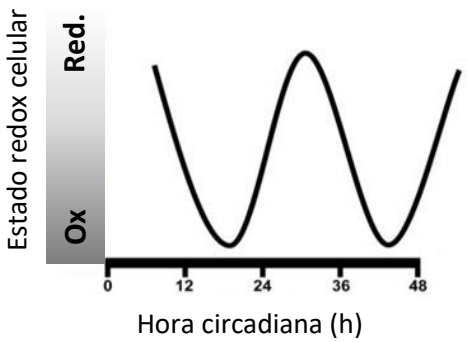


Figura 17. Ritmo circadiano del estado redox. En la figura, se ejemplifica la oscilación redox entre un estado oxidado y un estado reducido. En términos del ritmo circadiano en roedores, el estado redox en el tejido de los NSQ (medido como la tasa entre FAD:NADPH) posee un máximo de oxidación cercano a la hora circadiana (*circadian* time) 16 [221]. Figura modificada de [225].

El sistema circadiano permite a los organismos anticipar cambios en su tasa metabólica. De esta manera, es posible emplear en el momento adecuado recursos energéticos, enzimas antioxidantes, secuestradores de radicales libres, etc. En este sentido, se ha descrito una comunicación bidireccional entre el estado redox y la maquinaria molecular del reloj circadiano [226]. Esto se relaciona con la actividad y el nivel de expresión de ARNm de diferentes enzimas clave, así como de la respiración mitocondrial. Por ende, el balance redox debería reflejar cualquier cambio en la tasa metabólica o en la actividad del organismo (Fig. 18).

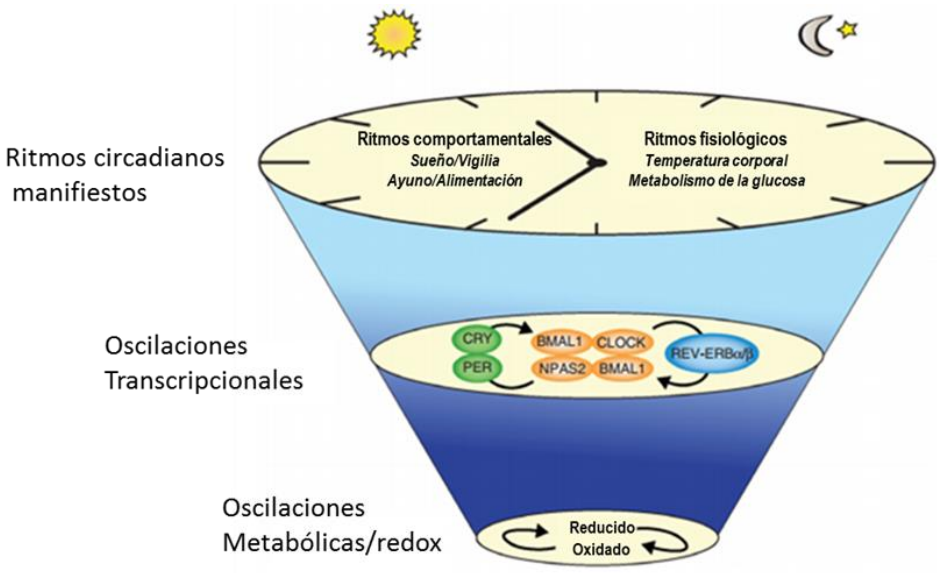


Figura 18. Modelo extendido del sistema circadiano. En este modelo propuesto, los ritmos circadianos serían generados por múltiples capas moleculares. Las oscilaciones transcripcionales (TTFL) resultan la primera capa de oscilaciones moleculares, permitiendo a la célula organizar su fisiología en un ciclo cercano a 24 horas. El TTFL interactúa con los ciclos redox y metabólicos subyacentes, quienes serían los conductores fundamentales de las oscilaciones auto-mantenidas Figura modificada de [226].

La determinación de oscilaciones circadianas en el estado de oxidación de la enzima dextoxificadora de ROS peroxirredoxina (PRX) en eritrocitos de ratones fue replicada en moscas (*Drosophila*), plantas (*Arabidopsis*), hongos (*Neurospora*), bacterias (*Synechococcus elongatus*), arqueas (*Halobacterium*) e incluso en humanos [227, 228]. Estos estudios sugieren que los relojes celulares pueden utilizar elementos comunes y evolutivamente muy antiguos. Las proteínas PRX, pueden haber conferido ventajas adaptativas en el comienzo de la vida aeróbica en la Tierra. Esto ocurrió hace 2500 millones de años con la aparición de los organismos fotosintéticos y la fotodisociación

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

del agua, lo que llevó a un rápido aumento en la concentración de oxígeno atmosférico, en lo que se conoce como el Gran Evento de Oxigenacion (GEO [229]). Este evento generó cambios catastróficos en la ecología del planeta, con la pérdida de muchos organismos anaeróbicos, pero que de manera interesante, coinciden con la aparición del primer reloj transcripcional-traduccional en cianobacterias [230]. Entonces, durante el GEO los ritmos de producción/consumo de oxígeno y generación de ROS estaban manejados por el ciclo solar, dando lugar a un reloj metabólico que aún hoy persiste en ausencia de un ciclo transcripcional-traduccional típico (Figura 19).

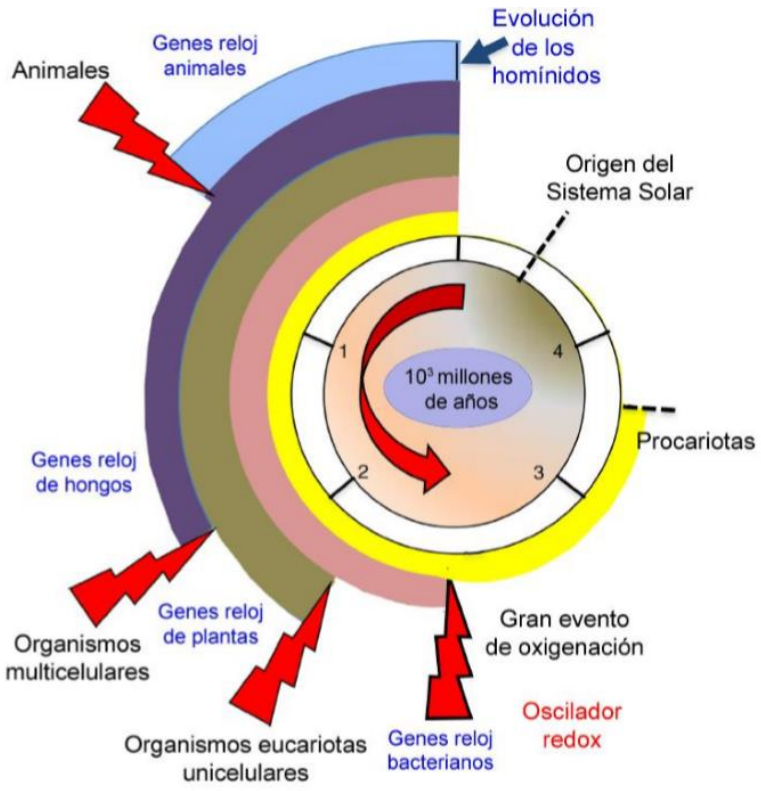


Figura 19. Evolución del reloj redox. La vida en la tierra comenzó hace aproximadamente 3500 millones de años. El gran evento de oxigenación (2500 millones de años atrás) puede haber llevado a la evolución de oscilaciones circadianas den especies reactivas de oxígeno y en sus mecanismos de detoxificación, mecanismos que fueron evolucionando e incorporados el reloj molecular tal como lo conocemos en la actualidad en organismos evolutivamente más jóvenes como los mamíferos Figura modificada de [231].

IV.D. Interacción entre el TTFL y el estado redox

La evidencia presentada hasta el momento sugiere que los ritmos circadianos podrían haber evolucionado a partir de ciclos metabólicos, lo que implica que las oscilaciones

transcripcionales (TTFL) se encuentran acopladas a este metabolismo oscilante, y en particular al estado redox. Esta hipótesis se encuentra fuertemente basada en varios ejemplos de *loops* citosólicos que interactúan con el reloj circadiano transcripcional y la fisiología celular [128, 232].

El *loop* mejor estudiado se basa en el cofactor NAD+. Los factores transcripcionales BMAL1/CLOCK controlan la expresión de la enzima central en la biosíntesis de NAD+, la nicotinamida foforibosiltransferasa (NAMPT) [233, 234]. Como resultado, los niveles de NAD+ oscilan en el citoplasma de manera circadiana generando la acetilación rítmica de BMAL1, PER2 e histonas a través de SIRT1, una deacetilasa sensible a este factor [92, 233, 234], modulando la unión directa a ADN del complejo BMAL1:CLOCK [93]. Sin embargo, la validación fisiológica de este mecanismo acoplado es aún discutida, debido, por ejemplo, a la compartimentalización del potencial redox en las células [215].

El cofactor hemo, una porfirina que contiene hierro, es capaz de afectar a los receptores nucleares REV-ERBα/β [218, 235] a través de un interruptor redox basado en tioles-disulfuro [218, 236]. En concordancia con estos resultados de mamíferos, el receptor nuclear E75, homólogo a Rev-Erb de *Drosophila* sp., juega un rol similar regulando el estado redox en moscas [237]. La expresión circadiana de delta-aminolevulinato sintasa (ALAS1), enzima limitante en la biosíntesis de esta porfirina, aporta un *loop* extra de regulación [238, 239].

Las proteínas del reloj molecular poseen un dominio característico, conocido como dominio PAS (Fig. 20 [240]), acrónimo formado a partir de los nombres de las proteínas en la que fue originalmente identificado: la proteína reloj "*period*" de *Drosophila* (PER), el receptor nuclear translocador de aril-hidrocarburos (ARNTL, o BMAL1) de vertebrados, y la proteína "*single-minded*" de *Drosophila* (SIM). Esta estructura se haya presente en las proteínas PER1/2/3, CLOCK (o NPAS2) y BMAL1 del reloj circadiano en mamíferos [241-243], mediando tanto la generación de la ritmicida como la sincronización del reloj. La presencia del dominio PAS se extendió a todos los reinos - *Archaea, Bacteria* y *Eukarya*- dejando en claro que, desde un punto de vista evolutivo,

se trata de un dominio muy antiguo y se plantea incluso la posibilidad de un origen común ancestral [240].

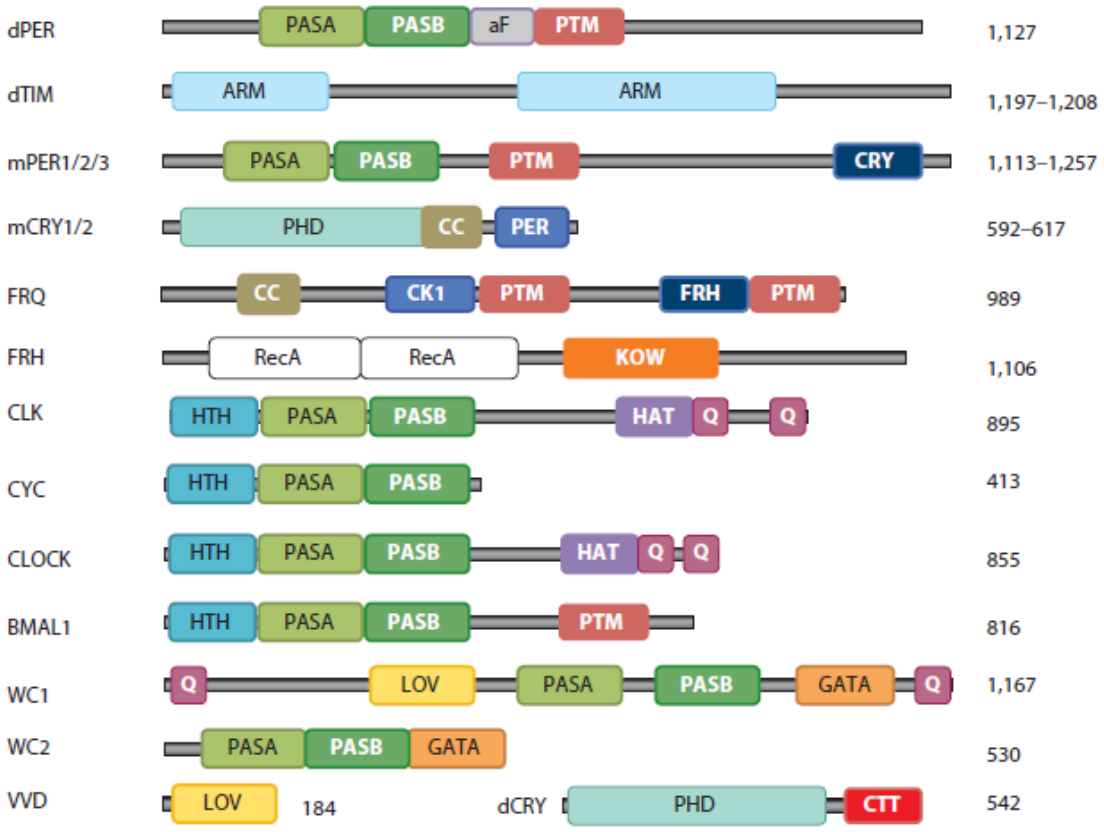


Figura 20. Arquitectura de los dominios de las proteínas del reloj molecular circadiano de diferentes organismos. Los dominios estructurales más representativos, independientemente del organismo, son: PASA y PASB (Per/Arnt/Sim), PTM (modificación postraduccional por fosforilación, glicosilación y/o acetilación); ARM (repeticiones helicoidales tipo armadillo); CRY (sitio de unión a criptocromo); PHD (dominio homólogo a fotoliasa); CC (dominio *coiled-coil*); PER (sitio de unión a period); CK1 (sitio de unión a casein quinasa 1); FRH (sitio de unión a FRH); RecA, ATPasa; KOW (unión a RNA); HTH (dominio de unión a DNA hélice-giro-hélice); HAT (histona acetiltrasnferasa); Q (activación transcripcional rica en glutamina); LOV (dominio sensible a luz, oxígeno y voltaje); GATA (unión a DNA dedos de zinc); CTT (cola C-terminal). El número de aminoácido de cada proteína se muestra a la derecha. Abreviaciones: d, Drosophila; m, mamífero; TIM, Timeless, VVD, vivid; WC: White-collar. Diagrama obtenido de [243]

El rol del dominio PAS radica, en parte, en los diferentes cofactores que pueden asociársele. En particular, todas las proteínas del reloj molecular que contienen éste dominio se asocian con el cofactor hemo. Este cofactor es sensible a gases di-atómicos,

tales como el oxígeno, el monóxido de carbono (CO), y el óxido nítrico (NO). Debido a que tanto la fase como el período de los ritmos circadianos son controlados por los niveles de CO y de NO [244], se ha propuesto una posible regulación directa de estos compuestos sobre el TTFL. Ensayos *in vitro* comprueban que en respuesta a monóxido de carbono (CO), el cofactor hemo se une al dominio PAS de NPAS2, promoviendo su disociación del complejo de unión a ADN con BMAL1, generando homodímeros inactivos de BMAL1 [245]. CLOCK ha sido caracterizado de igual manera, con capacidad de detectar al CO, pero también al NO [246].

Recientemente, la determinación cristalográfica de un átomo de Zn2+ en la interfase de PER2 y CRY1 [247] o CRY2 [248], permitió postular un sitio de regulación redox sobre el heterodímero PER2:CRY1, donde la oxidación de cisteínas generaría la desestabilización del heterodímero por pérdida de interación con el átomo de Zn2+ [247].

Sumado a estas interacciones bidireccionales entre el TTFL y el estado redox, existen varios estudios que reportan la influencia de perturbaciones redox sobre la ritmicidad circadiana. De relevancia para esta tesis, un estudio en peces cebra muestra que la señalización por H_20_2 podría estar relacionada con la transducción de la información fótica al reloj circadiano [249]. El tratamiento con este agente oxidante genera respuestas en los componentes circadianos similares a los causados por luz y, en el sentido inverso, la sobre-expresión de la enzima catalasa atenúa la respuesta a luz. En *Drosophila*, el tratamiento continuo con H_20_2 resulta en la supresión de los ritmos locomotores diarios, y la sobre-expresión condicional de SOD también altera los ritmos comportamentales [250]. De igual manera, en el hongo *Neurospora crassa*, manipulaciones genéticas en los niveles de ROS con mutantes para SOD o NADPH oxidasa resultan en oscilaciones incrementadas o arritmicidad respectivamente [251]. Finalmente, un experimento innovador recientemente publicado sugiere que la manipulación electroquímica del ambiente redox intracelular en cianobacterias es capaz de regular la función del reloj circadiano [252].

A modo de resumen se presenta la Figura 21, en la que se esquematizan las interacciones descriptas en la sección.

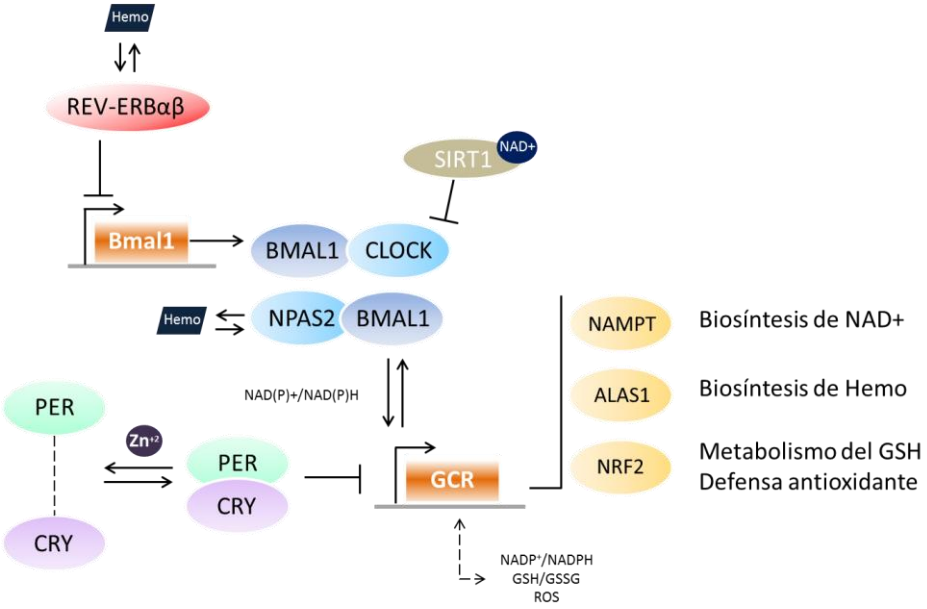


Figura 21. Interacción entre el sistema circadiano y vías redox. Esquema representativo de componentes canónicos del reloj circadiano en mamíferos y su interacción con las vías redox. Los factores de transcripción BMAL1/CLOCK o BMAL1/NPAS2 controlan la expresión circadiana de los genes Period (Per), Cryptochrome (Cry) y Rev-Erb. A su vez, controlan los genes involucrados en las vías redox, tal como: Nampt, quien codifica la proteína clave en la biosíntesis de NAD+; Alas1, involucrada en la biosíntesis del cofactor hemo; y el factor de transcripción relacionado con el estrés Nrf2. El estado redox intracelular afecta a las proteínas circadianas canónicas vía: cofactor hemo (actividad de unión a DNA de REV-Erv y NPAS-2). La heterodimerización entre PER2 y CRY1 o CRY2 está regulada mediante la interacción con el átomo de zinc (Zn2+) en la interfase entre las dos proteínas. Niveles oscilantes del cofactor NAD+, modulan la función de la enzima dependiente de NAD+, SIRT1 quien afecta la modificación post-traduccional de PER2 y BMAL1.

Es por lo anterior explayado que se propone resolver la siguiente paradoja: cómo hace una misma enzima (la nNOS) para señalizar de formas completamente distintas, dependiendo el momento del día en el que se active. A la luz de la información volcada en esta introducción teórica, se hipotetiza un control redox sobre la actividad de la enzima, cuya función dependerá del ciclo circadiano del estado redox celular, dictando una u otra cascada de transducción para su sincronización por luz. El objetivo general de este trabajo de tesis es modular farmacológicamente la sincronización fótica del reloj circadiano de mamíferos con el objetivo de profundizar el conocimiento del mecanismo fisiológico subyacente, permitiendo ensayar al mismo tiempo las propiedades cronobióticas de compuestos nitrérgicos con distinta capacidad oxidante.

CAPITULO 1.

CARACTERIZACIÓN DE LA N-NITROSOMELATONINA COMO UN CRONOBIÓTICO

INTRODUCCIÓN

La comprensión de las cascadas de transducción de señales involucradas en el efecto de la luz sobre el reloj circadiano resulta fundamental para modular farmacológicamente la sincronización fótica. Una variable crucial resulta también la diferencia ya expuesta entre la transducción para la sincronización por adelantos o por retrasos. En este capítulo se explorará aún más sobre tales diferencias, partiendo de la bifurcación rio debajo de una misma enzima, la Óxido Nítrico Sintasa neuronal (nNOS). Para ello, una posibilidad es que el NO producido en la noche temprana o tardía -que señaliza retrasos y adelantos respectivamente- actúe sobre diferentes sustratos ya caracterizados.

En este primer capítulo, empleamos un dador novedoso de óxido nítrico (NO), la N-nitrosomelatonina [253, 254] para incrementar los niveles de NO en los NSQ, de modo de potenciar la sincronización fótica del ritmo de actividad locomotora. Estudios previos demostraron el rol de este dador en la liberación de NO *in vitro* [255-258]; sin embargo, no hay estudios analizando los efectos neuroquímicos de este compuesto sobre la sincronización circadiana. En particular, se analizarán las propiedades cronobióticas de la N-nitrosomelatonina utilizando protocolos comportamentales de pulsos de luz y de re-sincronización a un ciclo LO (*jet lag* experimental). Estos ensayos nos permitirán proponer un posible mecanismo sobre la acción del NO en la cascada de transducción para la sincronización fótica.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

HIPÓTESIS

El compuesto novedoso N-nitrosomelatonina, es farmacológicamente activo a nivel de los NSQ, potenciando la sincronización fótica.

OBJETIVOS.

1. Comprobar la capacidad cronobiótica de la N-nitrosomelatonina actuando como dador de óxido nítrico en el reloj circadiano de mamíferos.

2. Evaluar el efecto de la N-nitrosomelatonina sobre los cambios de fase inducidos por pulsos de luz de los ritmos circadianos a nivel comportamental y molecular.

3. Determinar la acción de la N-nitrosomelatonina sobre la re-sincronización de los ritmos circadianos.

Drogas y tratamientos.

La N-nitrosomelatonina (NOMel) fue sintetizada como ha sido descripto previamente [258], a partir de Melatonina [Mel, Sigma Chem Co., St. Louis MO, USA). Para la inhibición específica de la nNOS, se utilizó N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, Cayman chemicals ® Ann Arbor, MI, USA). Toda preparación de los fármacos fue realizada en frío y en el momento de la inyección.

Si bien la vida media de la NOMel en solución acuosa se encuentra en el rango de los segundos [258], experimentos farmacocinéticos llevados a cabo en ratón con NOMel radiomarcada, demuestran que la droga llega al cerebro unos 10 minutos luego de la administración i.p. de 5mg/kg [256]. En esta tesis se utilizó una dosis de 2mg/Kg o 20mg/Kg según el caso; y se decidió administrarla 15 minutos antes del pulso de luz. El vehículo (Veh) estuvo compuesto de solución estéril salina al 0,5% de etanol para favorecer la disolución del fármaco. La L-NAME fue utilizada en una concentración final de 1mM en solución salina al 0,9% [161].

Animales y cirugía.

Se utilizaron hámsters siberianos (*Mesocricetus auratus*) machos adultos (3-4 meses de edad) mantenidos en el bioterio de la Universidad Nacional de Quilmes bajo un ciclo de 14h luz: 10h de oscuridad [(14:10 LO), hora reloj de apagado de las luces 20.00], con un promedio de 200 lux a nivel del sustrato de las jaulas, temperatura controlada a 20 ± 2°C, y recibiendo alimento balanceado para roedores y agua *ad libitum*. Los animales mantenidos en condiciones de oscuridad constante, fueron siempre manipulados bajo luz roja (aproximadamente < 5 lux).

Para aquellos experimentos dónde se realizaron administraciones intracerebroventriculares (i.c.v.), se implantó como guía una aguja-cánula- de acero inoxidable calibre 22 (Plastic Products, Roanoke, VA), dirigida al tercer ventrículo 1.0 mm por encima del sitio objetivo entre los NSQ (coordenadas desde bregma,

anterior/posterior = +0.6, medial/lateral = 0.0, dorsal/ventral = -8.0), bajo anestesia central (ketamina:xilacina 150:10 mg/kg, i.p.). Luego de la cirugía, los animales fueron mantenidos en ciclos 14:10 LO por unos 7 a 10 días para su recuperación, antes de ser transferidos a los distintos protocolos cronobiológicos. Todos los procedimientos con animales se realizaron utilizando protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidad y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional de Quilmes.

Experimentos comportamentales.

Para los experimentos comportamentales, los hámsters fueron transferidos a jaulas individuales provistas con lecho de viruta, recibiendo agua de la canilla y alimento (dieta para roedores, ACA Cooperación, Argentina) *ad libitum*. Las jaulas fueron equipadas con una rueda (diámetro 17 cm) para registrar la actividad locomotora, con una frecuencia de muestreo de 5 min para su posterior análisis. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones de OO por al menos 15 días, tiempo aproximado para cuantificar un período de libre curso (y por ende una fase) estable. Luego se realizaron los tratamientos, manteniendo las condiciones de OO. Los animales recibieron una única inyección i.p. de NOMel, Mel o Vehículo (Veh) 15 min antes de la estimulación lumínica con un pulso de luz "fría" blanca (pulso de luz -PL- , TL-D Estándar, Phillips ®). Un sub-grupo recibió PLs de intensidad sub-saturante (50 lux, 10 min), mientras que otro recibió PLs saturantes (300 lux, 10min). Los PLs fueron dados a CT14 para inducir retrasos de fase, y a CT18 para inducir adelantos de acuerdo a la CRF del hámster [259-261]]. Toda manipulación en condiciones de OO fue realizada bajo luz roja (<5 lux).

En el caso de los cambios de fase no fóticos, se procedió a registrar la actividad locomotora de un grupo de hámsters mantenidos en condiciones de OO durante al menos 15 días. Posteriormente los animales recibieron una inyección i.p. de NOMel, Mel o Vehículo (Veh) 15 min antes de administrar un estímulo no fótico (NP) a CT6, que consistió en cambiarles la jaula y el lecho de viruta por correspondientes limpios (Mistlberger 1992, Yannielli & Harrington 2004). El cambio de fase fue analizado entre

10 y 15 días post-tratamiento bajo OO. Los animales control solo recibieron el tratamiento farmacológico.

Para evaluar el mecanismo involucrado en la potenciación de los cambios de fase, se procedió con la co-administración de L-NAME y NOMel. La disolución de L-NAME fue preparada el día de la inyección tomando la droga del stock y diluyendo a una concentración de 1mM. Se administró por vía i.c.v. 1 ul de esta solución o Veh durante 1 min. Los hámsters recibieron una inyección i.p. de NOMel, Mel o Veh junto a la administración i.c.v. de L-NAME o Veh 15 min antes del PL a CT18. El horario para CT12 fue obtenido a partir de los actogramas extrapolando el inicio de la actividad. Los cambios de fase fueron calculados extrapolando una línea recta a través de los inicios de actividad, considerando al menos 10 días previos, y otra línea con la misma pendiente entre 10 a 15 días post-exposición a la luz. La diferencia entre la extrapolación de estas dos líneas fue tomada en el día del PL, permitiendo cuantificar los cambios de fase. Las medias reportadas fueron obtenidas a través de mediciones llevadas a cabo por tres observadores ciegos al procedimiento experimental.

Para los experimentos de re-sincronización a un ciclo LO (jet-lag experimental), un grupo de animales fue transferido a jaulas individuales equipadas con ruedas y mantenidos inicialmente bajo ciclos LO 14:10 [apagado de las luces (L-Off) 14.00h y encendido (L-ON) a las 24.00h] por al menos 10 días. Luego, 2 subgrupos fueron expuestos a un adelanto, o a un retraso abrupto de 6h en la fase del ciclo de LO. Para el protocolo de 6h de adelanto, los animales sufrieron un cambio por “noche corta”: en el día del cambio del ciclo, L-Off fue mantenida a 14.00h, mientras que el L-On fue adelantado desde las 24.00h hasta las 18.00h. Al día siguiente, L-Off fue adelantado desde las 14.00h a las 8.00h, quedando establecido el nuevo ciclo LO 14:10 (L-Off 8.00 h; L-On 18.00 h). Para el protocolo de retrasos, los animales sufrieron un cambio por “día largo”: en el día del cambio, L-Off fue retrasado desde las 14.00h a las 20.00h, y L-On del día siguiente, desde las 24.00 a las 6.00h, estableciendo el nuevo ciclo LO 14:10 (L-Off 20.00 h; L-On 6:00 h). En la Figura 22 se representa un esquema de ambos protocolos de jet-lag. El tratamiento farmacológico fue realizado en el mismo día del cambio del ciclo. Dentro de cada protocolo de jet-lag, los animales fueron divididos en grupos para administrarles una inyección i.p. de NOMel, Mel o Veh, a ZT18 o a ZT14

para protocolos de adelantos o retrasos, respectivamente. Para estudiar la re-sincronización del ritmo de actividad locomotora, se contó desde el día del cambio del ciclo LO el número de días hasta observar en los actogramas que el inicio de actividad esté nuevamente sincronizado con el apagado de las luces, reportando las medias obtenidas por tres observadores ciegos para el procedimiento experimental (Fig. 22).

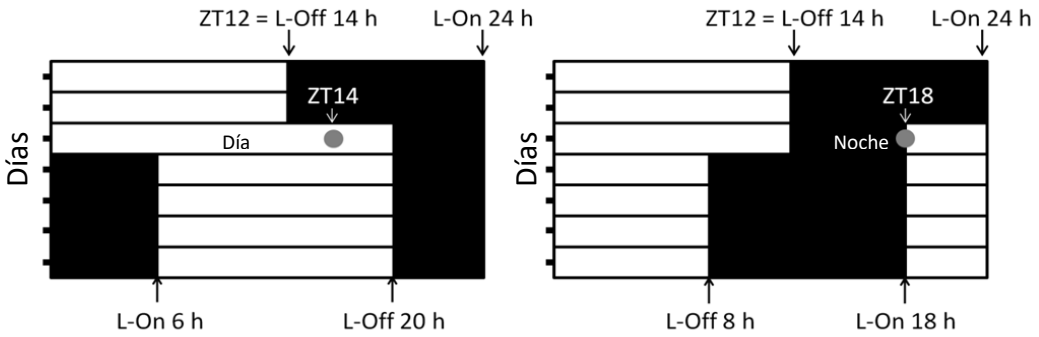


Figura 22. Esquema explicativo de los protocolos de Jet Lag. Se muestra el cronograma de luz:oscuridad. Los animales son mantenidos inicialmente bajo 14 horas de luz (blanco): 10 horas de oscuridad (negro), con la hora de apagado de luces (L-Off) a 14h, y prendido (L-On) a 24.00h. El tratamiento farmacológico se indica con un círculo gris, el tiempo de administración (ZT14 o ZT18, para protocolo de retrasos y adelantos respectivamente), fue de acuerdo al ciclo LO original, definiendo como ZT12 al L-Off 14.00h.

Inmunohistoquímicas.

Para los experimentos de inmunohistoquímica, los animales fueron mantenidos bajo el ciclo normal de LO 14:10, para ser luego transferidos a condiciones de OO por un día completo. Al segundo día en OO, el ZT12 (L-Off) fue extrapolado a CT12 (i.e., Protocolo Tipo II de Aschoff [262]), y se administraron inyecciones i.p. de NOMel, Mel y Veh 15 min antes de un PL (50 o 300 lux, 10 min, según el caso) dado a CT14 o a CT18 (los controles solo recibieron el tratamiento farmacológico). Luego de una hora post-LP, los animales fueron profundamente anestesiados con la mezcla de ketamina:xilacina (150:10 mg/kg, i.p.) y perfundidos intracardiacamente con buffer fosfato salino 0.01M (PBS), seguido de la solución fijadora (4% p/v paraformaldehído en 0.1M de buffer fosfato, pH 7.4). Los cerebros fueron disecados, post-fijados durante una noche a 4° en

la misma solución fijadora, criopreservados por deshidratación en solución de 30% sacarosa en PBS por 24h, y finalmente congelados a -80° C por al menos un día. Se obtuvieron cortes coronales (30 µm de grosor) del cerebro seccionando antero-posteriormente todo el quiasma óptico con un criostato, y se colectaron en PBS 0.01M. Los cortes fueron lavados con 0.4% Tritón X-100 en 0.01M PBS (PBST). Las uniones no específicas fueron bloqueadas con 2% de suero normal de caballo y 5% de leche descremada en PBST por 1.5h a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo primario anti-cFOS (Santa Cruz Biotechnology Inc.) a un dilución 1.2000 en PBST por 72h a 4° C, y luego con un anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón/conejo IgG (H+L) hecho en caballo (Vector Laboratories) diluido 1:200 en PBST por 2h a temperatura ambiente. La reacción fue amplificada con el complejo avidina-biotina y visualizada con el sustrato cromógeno VIP (Vectastatin Elite ABC kit, Vector Laboratories).

La cuantificación de células positivas se realizó sobre cuatro cortes consecutivos para cada cerebro, y el valor medio fue usado para los ensayos estadísticos posteriores. El conteo celular fue realizado con el programa Image J. 1.29 (NIH) como ya fue previamente descripto [263].

Medición de nitritos y nitratos.

Los hámsters fueron sometidos a un protocolo Aschoff Tipo II (ver sección "Inmunohistoquímica"), recibiendo inyecciones i.p. de NOMel, Mel o Veh 15 min antes de un PL a CT18 (los animales controles solo recibieron el tratamiento farmacológico). A su vez, otros subgrupos de animales recibieron NOMel o Veh, tanto a CT14 como a CT18. Todos los animales fueron decapitados 15 min luego del PL y sus cerebros fueron diseccionados y preservados a -80° C. Se tomó un corte coronal de 1mm de espesor a la altura del quiasma óptico, obteniendo un *punch* de tejido hipotalámico de 1mm de diámetro conteniendo los NSQ. El tejido fue disgregado en 100ul PBS, pH 7.4. Los homogenatos fueron filtrados por centrifugación (Vivaspin-500 ultrafilters of 3,000 MWCO Sartorius stedim biotech). La medición de nitritos, nitratos, y proteínas, fueron realizados utilizando un kit comercial (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, LDH

Method Cayman chemical® y Bio-Rad Portein Assay). Los valores fueron relativizados en proporción a la cantidad de proteína en la muestra. Para facilitar el análisis estadístico, cada valor fue considerado relativo al valor medio del grupo vehículo.

Análisis estadísticos.

Se realizó un ANOVA de dos vías para determinar diferencias significativas para los cambios de fase, los valores de nitratos y nitritos, y el número de células cFOS positivas, tomando tanto el estímulo (PL u oscuridad) y el tratamiento farmacológico (NOMel, L-NAME, L-NAME-NOMel, Mel o Veh) como factores. Por otro lado, se realizó un ANOVA de una vía para analizar el efecto de los tratamientos sobre el número de días para re-sincronizar en los protocolos de jet lag. Un ANOVA de dos vías de medidas repetidas permitió evaluar los cambios en el período endógeno entre las etapas sucesivas de los protocolos. Una vez determinada la significancia en los factores del ANOVA, se realizaron test post-hoc diseñando los contrastes específicos. El nivel de significancia utilizado para todos los ensayos estadísticos fue del 5% ($p=0.05$).

Efecto de la N-nitrosomelatonina sobre los cambios de fase del ritmo de actividad locomotora en rueda.

Todos los PLs administrados en la noche tardía (CT18) provocaron adelantos de fase en el ritmo de actividad locomotora [Fig. 23 a. (ANOVA de dos vías, para tratamiento lumínico: $p<0.0001$)]. Los animales que fueron tratados con NOMel previo al PL (grupo NOMel-PL) sufrieron un cambio de fase dos veces mayor comparado a los controles (Veh-LP o Mel-PL). No se hallaron diferencias significativas entre los grupos Mel-PL y Veh-PL, o entre los controles sin pulso (grupo "*solo droga*").

Para el caso de los PLs administrados a CT14 (noche temprana), todos ellos generaron retrasos de fase significativos [Fig. 23 b. (ANOVA de dos vías, para tratamiento lumínico: $p<0.001$)]. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos analizados o entre los tratamientos con droga sin PLs. Una dosis superior de NOMel tampoco demostró tener efecto potenciador (Fig. 24), ni tampoco mostró diferencias respecto al grupo tratado con la dosis menor (comparación no mostrada, $p>0.05$).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

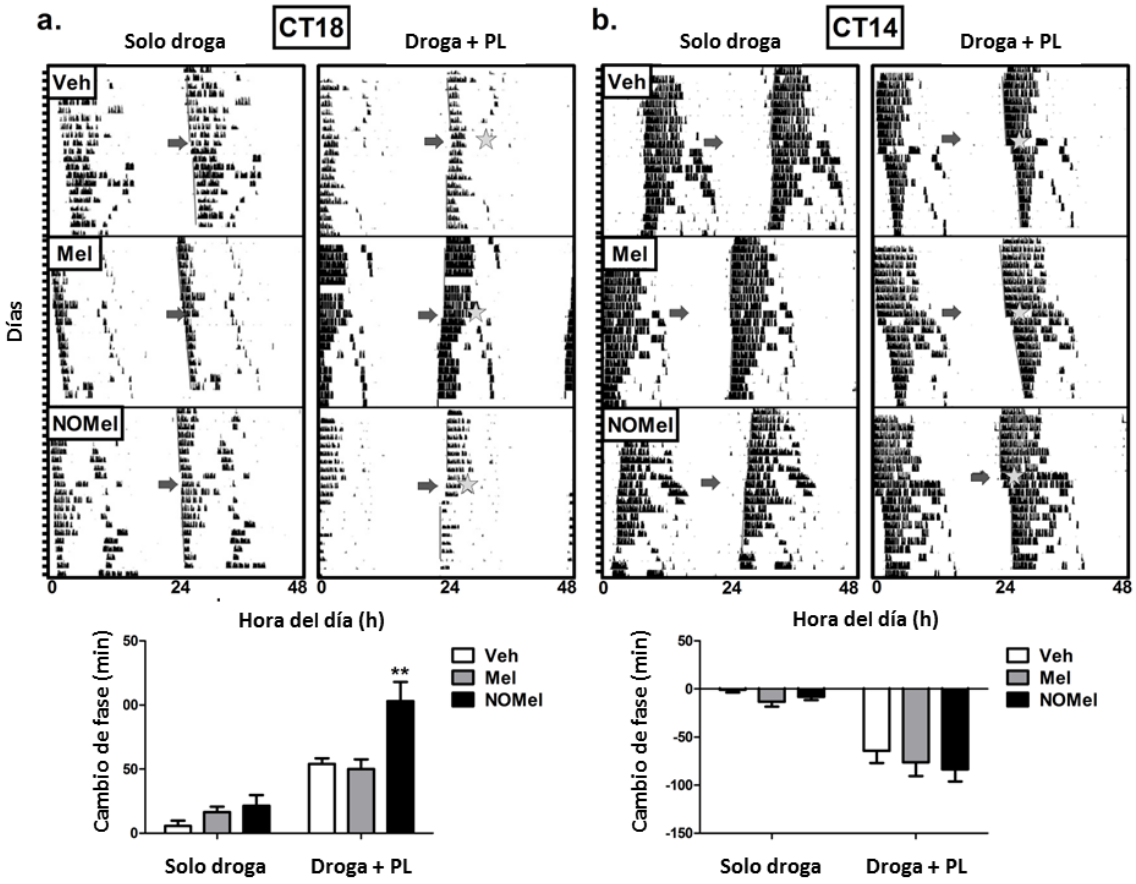


Figure 23. Efecto de la NOMel sobre los cambios de fase inducidos por luz. La figura muestra actogramas representativos en gráfico doble del ritmo de actividad locomotora de hámster en condiciones de oscuridad constante. Los animales fueron tratados por vía i.p. con vehículo (Veh), melatonina (Mel) o N-nitrosomelatonina (NOMel), 15 min antes del pulso de luz (PL) subsaturante (10min, 50lux) a la hora circadiana (CT) 18 (a., panel izquierdo) o a CT14 (b., panel derecho). Los animales control solo recibieron el tratamiento farmacológico sin el estímulo lumínico (grupo "*solo droga*"). El día del tratamiento está indicado con una flecha. La estimulación lumínica está indicada con una estrella. Se empleó el comienzo de la actividad para el cálculo de los cambios de fase del ritmo. La media ± SEM de los cambios de fase se muestran por debajo de los actogramas (Para CT18: ANOVA de dos vías, para el tratamiento farmacológico: $p<0.0001$, seguido de Bonferroni post-test: NOMel-PL vs. Veh-PL y NOMel-PL vs. Mel-PL **$p<0.001$; Veh-PL and Mel-PL: n = 8, NOMel-PL: n = 9, Mel and VeH: n = 7, NOMel: n=8. Para CT14: Mel-PL y Veh-PL: n = 6, NOMel-PL: n = 7, Mel and NOMel: n = 5; Veh: n = 7).

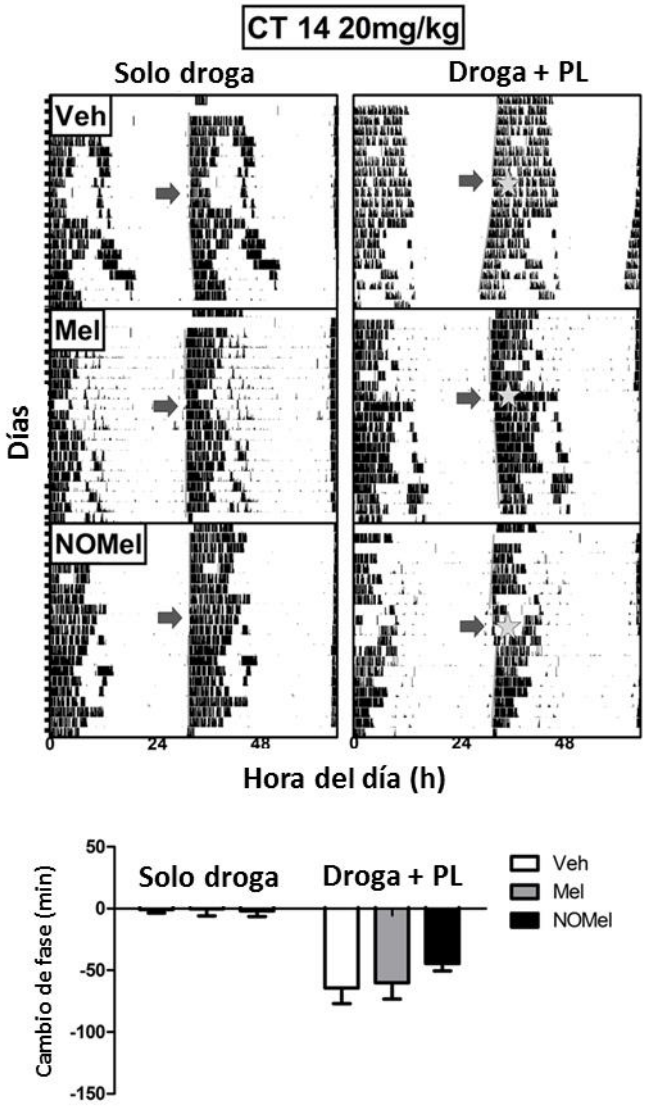


Figura 24. Efecto de 20mg/kg NOMel sobre los retrasos de fase inducidos por luz. Actogramas representativos de gráfico doble mostrando el ritmo de actividad locomotora en rueda de hámster en condiciones de oscuridad constante, tratados por vía i.p. con vehículo (Veh), melatonina (Mel) o N-nitrosomelatonina (NOMel), 15 min antes del pulso de luz (PL) subsaturante (10min, 50lux) a la hora circadiana (CT) 14. Los Animales control solo recibieron el tratamiento farmacológico sin el estímulo lumínico (grupo "*solo droga*"). El día del tratamiento está indicado con una flecha. La estimulación lumínica está indicada con una estrella. El comienzo de la actividad se encuentra indicado por líneas derechas trazadas sobre los actogramas, definiendo la fase del ritmo. La media ± SEM de los cambios de fase se muestra por debajo de los actogramas (ANOVA de dos vías, $p<0.0001$ para tratamiento lumínico; Veh-PL: n=6; Veh alone and NOMel-PL: n = 7, NOMel: n=8 Mel: n = 9; Mel-PL: n = 10).

También se analizó el efecto de la NOMel sobre pulsos saturantes (Fig. 25). Todos los grupos que recibieron el PL sufrieron cambios de fases significativos (ANOVA de dos vías, para el tratamiento lumínico: $p<0.0001$), pero no se hallaron diferencias significativas para el factor droga. El cambio de fase obtenido para los grupos con LP fue similar al obtenido para el grupo tratado con NOMel y pulso subsaturante ($p>0.05$).

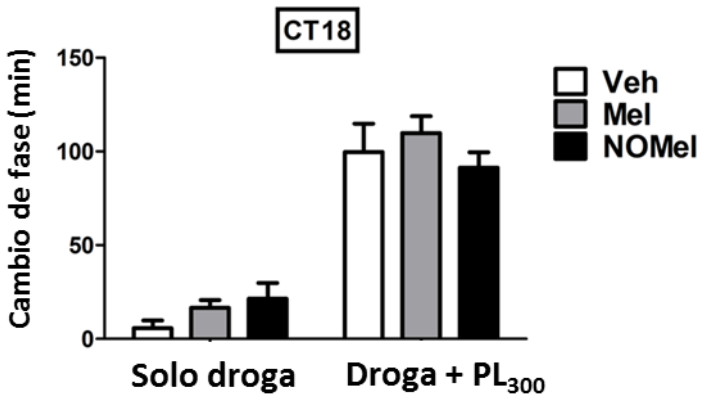


Figure 25. Efecto de la NOMel sobre los cambios de fase inducidos por pulsos de luz saturante. Hámsters bajo condiciones de oscuridad constante recibieron inyecciones i.p. de vehículo (Veh), melatonina (Mel) o N-nitrosomelatonina (NOMel) 15 min antes de un pulso de luz saturante (300 lux, 10min -PL_{300}-) a hora circadiana (CT) 18. Se muestra la media ± SEM de los cambios de fases resultantes (Mel-PL and NOMel-PL: n=6; Veh y Veh-PL: n = 7, NOMel y Mel: n=8 Mel).

El efecto de la NOMel también fue analizado para el caso de los cambios de fase no-fóticos. Independientemente del tratamiento farmacológico, el estímulo NP generó un adelanto de fase significativo (comparado con animales control sin NP) de alrededor de 25 min (Fig. 26). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre los diferentes grupos (NOMel, Mel o Veh).

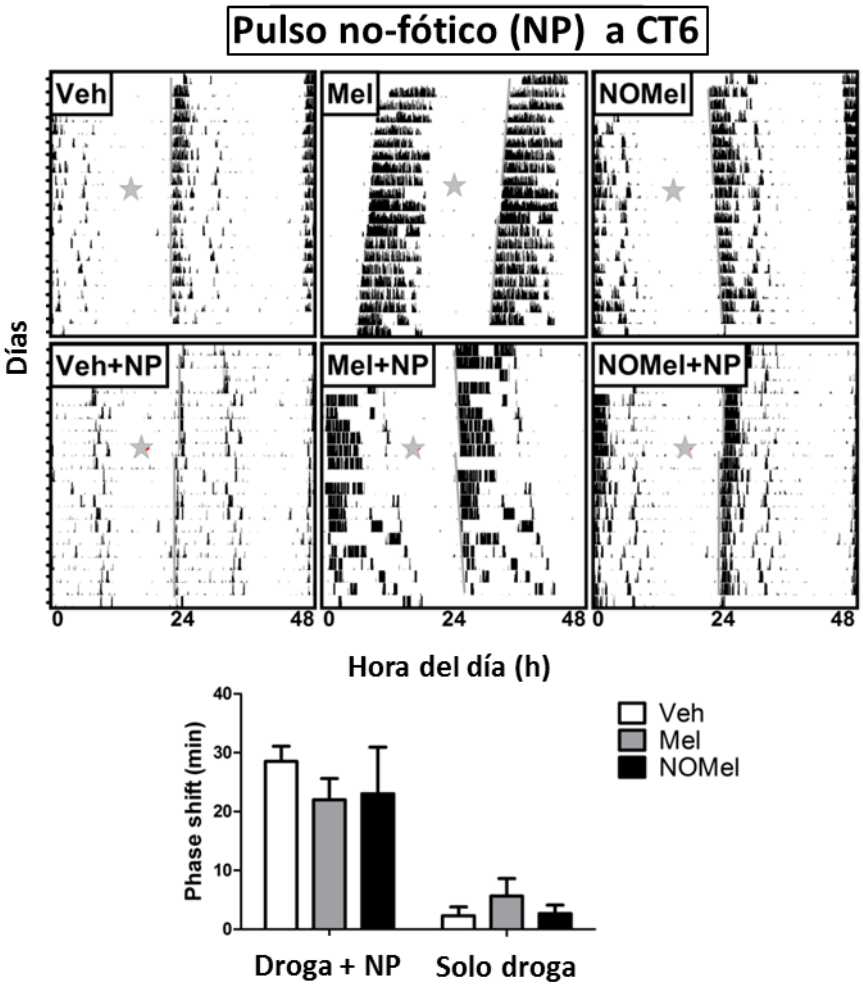


Figura 26. Efecto de la NOMel sobre los cambios de fase no fóticos. Actogramas representativos de gráfica doble mostrando el ritmo de actividad locomotora en rueda de hámster en condiciones de oscuridad constante, tratados por vía i.p. con vehículo (Veh), melatonina (Mel) o N-nitrosomelatonina (NOMel), 15 min antes del pulso no fótico (NP) a la hora circadiana (CT) 6 (indicado con una estrella). Los animales control solo recibieron el tratamiento farmacológico. El comienzo de la actividad se encuentra indicado por líneas derechas trazadas sobre los actogramas, definiendo la fase del ritmo. La media ± SEM de los cambios de fase se muestra por debajo de los actogramas (ANOVA de dos vías, $p<0.0001$ para NP; NOMel, Veh, Mel y NOMel-NP: n=3, Mel-NP: n=4, Veh-NP: n=5).

Finalmente, ninguno de los tratamientos realizados generó efectos estadísticamente significativos sobre el período endógeno mantenido bajo OO (Tabla 3.)

TABLA 3. Períodos endógenos para los tratamientos farmacológicos.

		Período endógeno (h)		
	Grupos	**Pre-tratamiento**	**Post-tratamiento**	**Significancia**
CT18	NOMel	24,03 ± 0,10	24,12 ± 0,33	p>0.05
	NOMel+PL_50lux	23,98 ± 0,15	24,16 ± 0,21 h	p>0.05
	NOMel+PL_300lux	24,01 ± 0,54	23,88 ± 0,48	p>0.05
	NOMel	23,88 ± 0,10	24,03 ± 0,20	p>0.05
CT14	NOMel-PL	24.12 ± 0,16	24,02 ± 0,35	p>0.05
	10XNOMel	23,20 ± 0,31	23,09 ± 0,23	p>0.05
	10XNOMel-PL	24,78 ± 0,67	23,86 ± 0,78	p>0.05
CT6	NOMel	24,24 ± 0,10	24,51 ± 0,33	p>0.05
	NOMel NP	23,77 ± 0,35	24,06 ± 0,41 h	p>0.05

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

Efecto de la N-nitrosomelatonina sobre la activación neuronal fótica en los Núcleos Supraquiasmáticos.

Tanto a CT14 como CT18, el estímulo lumínico generó un incremento en el número total de células cFOS-positivas en los NSQ, comparado contra los grupos control que sólo recibieron el tratamiento farmacológico – droga o vehículo - (Fig. 27, ANOVA de dos vías, para LP: $p<0.0001$). El tratamiento con NOMel antes del PL a CT18 generó un incremento (~50%) de células cFOS-positivas respecto a los controles. Sin embargo, este no fue el caso para el grupo tratado a CT14. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos Mel-PL y Veh-PL, ni tampoco entre los controles sin el estímulo lumínico, para ambos CTs.

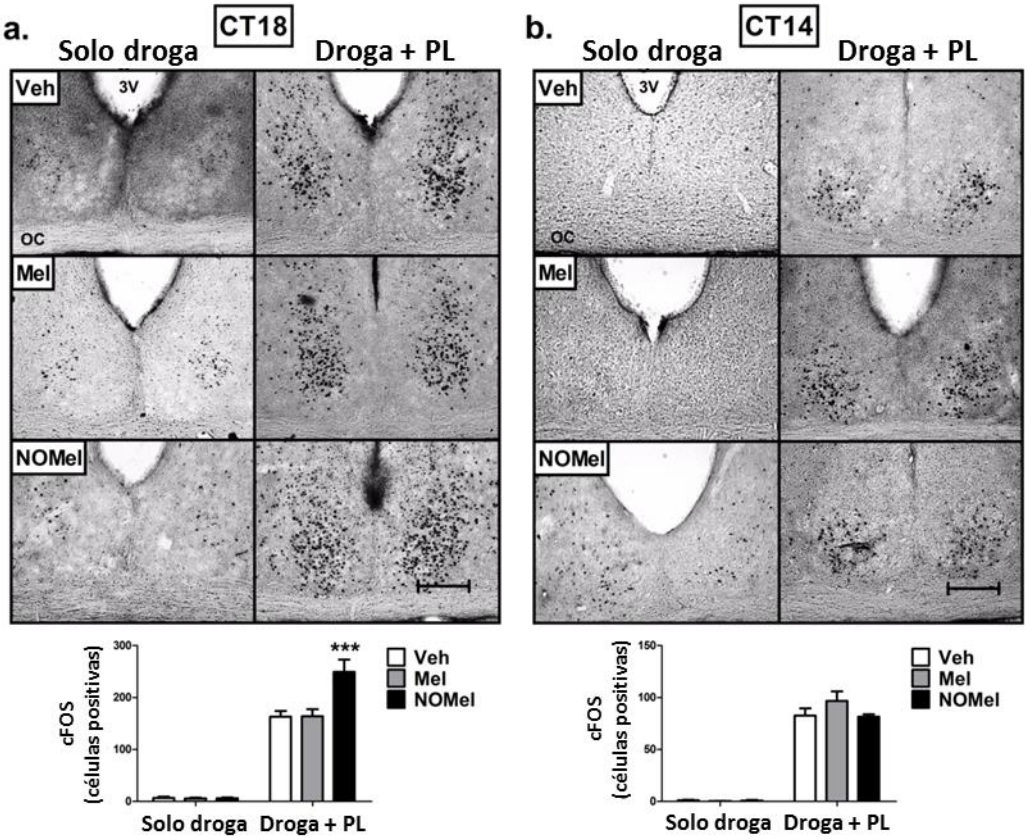


Figura 27. Efecto de la N-nitrosomelatonina en la activación neuronal inducida por luz en los Núcleos Supraquiasmáticos. La figura muestra cortes coronales representativos utilizados para detectar la expresión del marcador de activación neuronal cFOS en los NSQ de hámsters sacrificados 60 min después del LP subsaturante (10min, 50lux) a CT18 (a., panel izquierdo) y CT14 (b., panel derecho). Los animales recibieron el tratamiento farmacológico 15 min antes del estímulo lumínico ("*Droga+PL"*). Los animales controles recibieron solo el tratamiento farmacológico ("*droga sola"*). Se indica la media ± SEM

del número de células cFOS positivas (Para CT18: ANOVA de dos vías, para el tratamiento farmacológico: p<0.0001; Bonferroni post-test: NOMel-PL vs. Veh-PL y NOMel-PL vs Mel-PL ***p<0.001; n=4 para todos los grupos). 3V, tercer ventrículo; OC, quiasma óptico. Referencia = 200 µm.

También se analizó la inducción de cFOS en los NSQ del hámster luego del tratamiento con LPs saturantes a CT18 (Fig. 28). Todos los grupos que recibieron el estímulo lumínico mostraron un incremento en el número de células cFOS-positivas comparado con los controles (ANOVA de dos vías, para LP: p<0.0001). El tratamiento con NOMel mostró un incremento significativo en la inducción de cFOS.

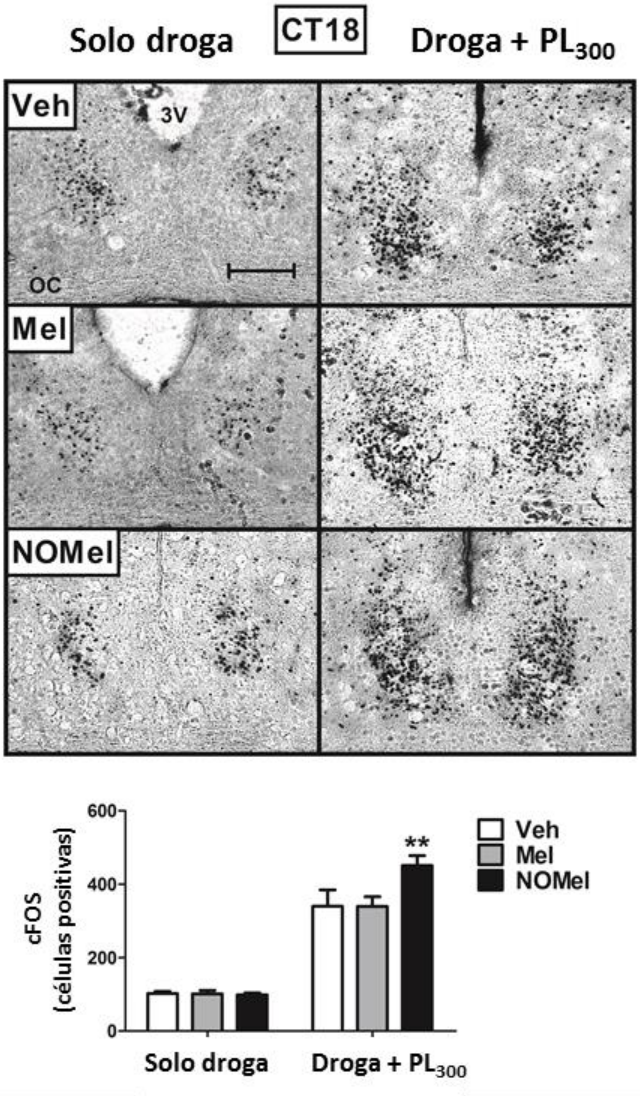


Figura 28. Efecto de la N-nitrosomelatonina en la activación neuronal de los Núcleos Supraquiasmáticos luego de pulsos saturantes a CT18. Cortes coronales representativos que ilustran la expresión del marcador de activación neuronal cFOS en los NSQ, 60 min luego del pulso de luz saturante (10 min a 300lux -PL_{300}-) a CT18. Los animales recibieron el tratamiento farmacológico 15 min antes del estímulo lumínico (*"droga+PL_{300}"*). Los animales controles recibieron solo el tratamiento farmacológico (*"solo droga"*). Se indica la media ± SEM del número de células cFOS positivas (Para CT18: Bonferroni post-test NOMel-PL vs. Mel-PL y NOMel-PL vs. Veh-PL **p<0.01; n=4 para todos los grupos). 3V, tercer ventrículo; OC, quiasma óptico. Referencia = 200 µm.

Efecto de la N-nitrosomelatonina en la inducción fótica de los niveles de Nitritos y Nitratos en los Núcleos Supraquiasmáticos.

Independientemente del tratamiento lumínico, todos los animales administrados con NOMel a CT18 mostraron un incremento en los niveles de Nitritos y Nitratos en los NSQ (Fig. 29). Los grupos control no muestran aumento luego del pulso de luz.

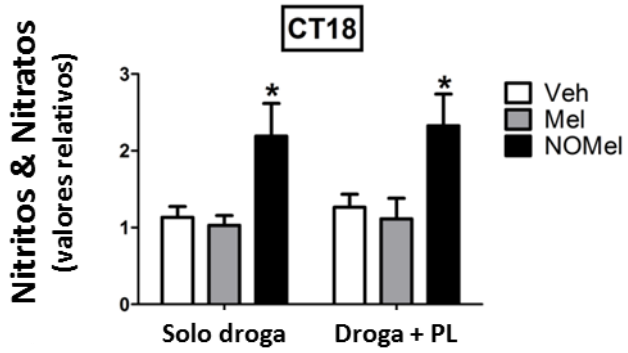


Figura 29. Efecto de la N-nitrosomelatonina en los niveles de nitritos y nitratos en los Núcleos Supraquiasmáticos. Se indica la media ± SEM de los valores relativizados obtenidos a partir de homogenatos de NSQs de animales que recibieran el estímulo lumínico a CT18 ("*droga+PL"*). Los animales controles recibieron solo el tratamiento farmacológico ("*solo droga").* Los valores fueron primeros relativizados a la concentración total de proteínas de cada muestra, y luego a la media del grupo Veh-Drug Alone (ANOVA de dos vías, para el tratamiento farmacológico: $p<0.0001$; Bonferroni post-test: NOMel vs. Veh o Mel y NOMel+PL vs. Veh-PL o Mel+PL: $p<0.05$; Veh y Mel-PL: n = 9, NOMel: n = 10, Mel y NOMel-PL: n = 11, Veh-PL: n = 12).

Para corroborar si la biodisponibilidad de la NOMel en el cerebro era dependiente de la hora circadiana, se procedió a analizar los niveles de nitritos y nitratos en los NSQ de animales inyectados con NOMel tanto a CT14 y CT18. La droga indujo un aumento en la cantidad de nitritos y nitratos de manera similar en ambos CTs (Fig. 30).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

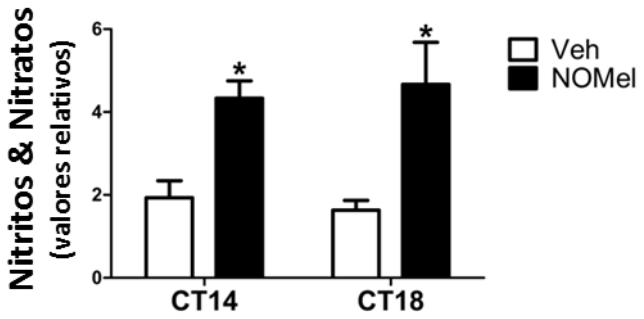


Figura 30. Efecto de la N-nitrosomelatonina en el nivel de nitritos y nitratos de los Núcleos Supraquiasmáticos a CT14 y CT18. Se indica la media ± SEM de los valores relativizados obtenidos a partir de homogenatos de NSQs de animales que recibieran NOMel o vehículo a CT18 o CT14. Los valores fueron relativizados a la concentración total de proteínas de cada muestra (ANOVA de dos vías, para tratamiento farmacológico: $p<0.005$; Bonferroni post test para ambos CTs: $*p<0.05$, n=3 para todos los grupos).

Efecto de la co-administración de N-nitrosomelatonina, y el inhibidor de la Óxido Nítrico Sintasa, L-NAME, sobre los cambios de fase fóticos.

Como se observa en la Figura 31, el pulso de luz indujo adelantos de fase significativos en los animales tratados con vehículo (Fig. 31). Estos cambios de fase fueron significativamente atenuados (prácticamente bloqueados) por acción del inhibidor de la NOS (N-nitro-L-arginina metil éster, L-NAME). Sin embargo, cuando la NOMel fue co-administrada con el inhibidor previo al pulso de luz, tal atenuación fue moderada. A su vez, no se observaron diferencias entre los grupos Veh-PL y L-NAME-NOMel-PL, o entre los grupos control solo tratados con las drogas.

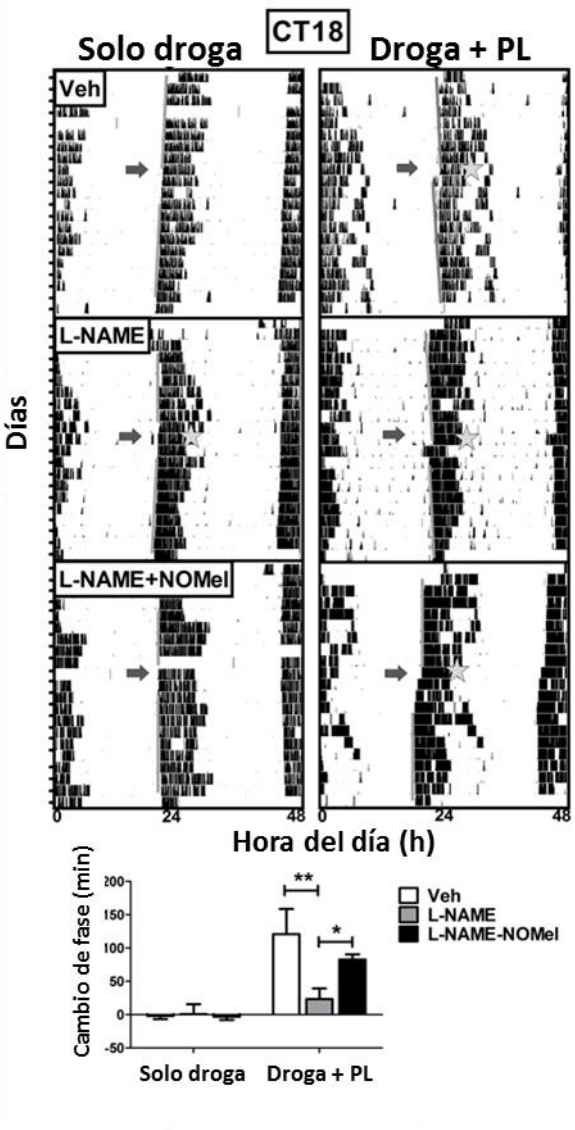


Figure 31. Efecto de la co-administración de N-nitrosomelatonina y L-NAME. Se muestran actogramas representativos de ploteo doble de la actividad locomotora en rueda de hámster mantenidos en condiciones de oscuridad constante tratados i.c.v. con vehículo (Veh), L-NAME y/o N-nitrosomelatonina (NOMel) por vía i.p., 15 min antes de un pulso de luz (PL) subsaturante a CT18. Los animales control solo recibieron el tratamiento farmacológico. El día del tratamiento y el momento del PL, se indican con una flecha y una estrella respectivamente. El inicio de la actividad se indica con líneas grises dibujadas sobre el actograma, definiendo la fase del ritmo. Se indica la media ± SEM de los cambios de fase (ANOVA de dos vías, $p<0.0001$ para PL y $p<0.05$ para el tratamiento farmacológico; Bonferroni post-test: LNAME+PL vs. Veh+PL $^{**}p<0.01$, LNAME+PL vs. LNAME-NOMel+PL $^{*}p<0.05$, Veh, Veh+PL, L-NAME-NOMel y L-NAME+PL: n = 4, L-NAME: n = 5, L-NAME-NOMel-PL: n = 7).

Efecto de la N-nitrosomelatonina sobre la re-sincronización a un jet-lag experimental.

Los animales tratados con NOMel a ZT18 en el día del adelanto de 6h en el esquema LO (grupo "*LO Adelanto*"), incrementaron significativamente su tasa de re-sincronización al nuevo ciclo de LO, comparado con los animales inyectados con Mel o Veh (Fig. 32. a.). Por otro lado, no se obtuvieron diferencias en el protocolo de jet-lag por retrasos de 6h (Fig. 32. b.).

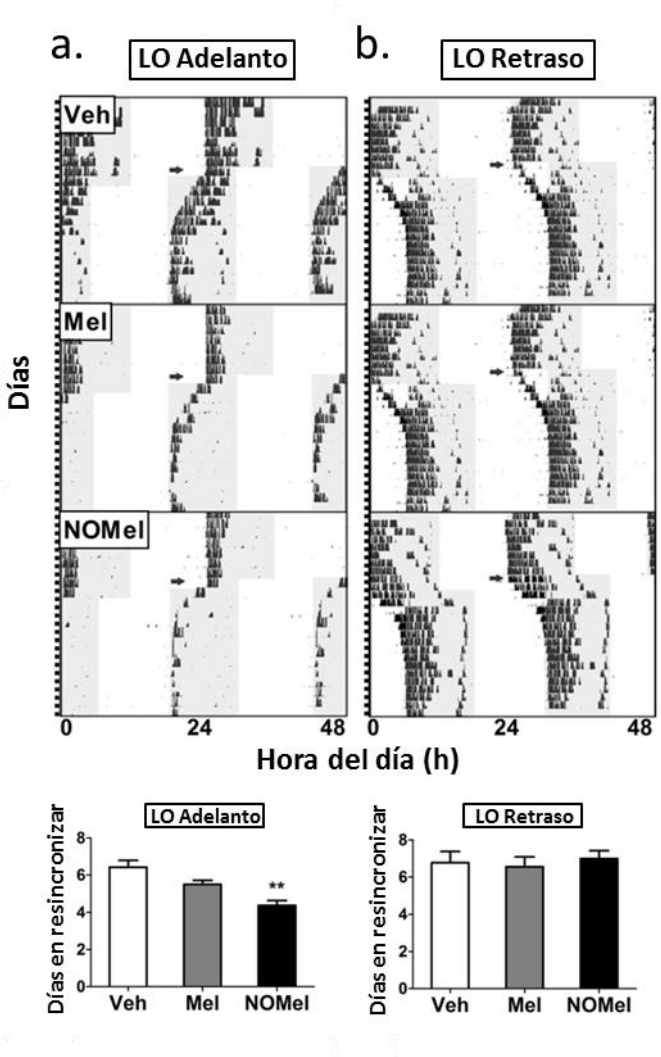


Figura 32. Efecto de la N-nitrosomelatonina sobre la re-sincronización a un jet lag experimental. La figura muestra actogramas representativos de doble gráfica evidenciando la re-sincronización del ritmo de actividad locomotora luego de un cambio de 6h por **a.** adelanto ("*LO-Adelanto"*, izquierda) o **b.** retraso ("*LO-Retraso", derecha*) del ciclo de luz oscuridad, tratados con Veh, Mel o NOMel. Las áreas sombreadas indican la fase de oscuridad. La flecha indica el día del cambio del ciclo de LO, siendo las inyecciones administradas a ZT 18 o ZT14 para el caso de adelanto y retraso, respectivamente. Se muestra para ambos protocolos la media ± SEM de los días que tardan en re-sincronizar al nuevo ciclo de LO (LO-Adelanto: ANOVA de una vía, $p<0.001$, seguido de Tukey Test: NOMel vs. Veh $^{**}p<0.01$, NOMel vs. Mel $p<0.05$, Veh vs. Mel $p>0.05$; Mel: n = 6, Veh: n = 7, NOMel: n = 8; LO-Retraso: Mel: n = 10, NOMel and Veh: n = 12).

Los experimentos comportamentales demuestran de forma consistente que la NOMel potencia solamente los adelantos de fase inducidos por luz del ritmo de actividad locomotora en los hámsters. Este efecto fase-dependiente fue observado tanto en protocolos de PL (Fig. 23) como en protocolos de *jet lag* experimental (Fig. 32). Incluso para una dosis 10 veces mayor (10x), la NOMel falló en potenciar los retrasos de fase (Fig. 24). Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió continuar con la dosis más baja para el resto de los experimentos. Se debe además aclarar que todos los animales mostraron un comportamiento normal (p. ej., acicalamiento, exploración, actividad locomotora) luego de la administración de las drogas, incluso para la concentración 10x (datos no mostrados).

Se ha demostrado que pulsos de luz administrados durante la fase de oscuridad inducen la expresión de diversos genes de expresión temprana, incluyendo c-fos [22, 264, 265], el cual, a pesar de no estar directamente correlacionado con la magnitud del cambio de fase, es considerado como un marcador de activación neuronal del reloj circadiano. Experimentos previos en nuestro laboratorio mostraron que el bloqueo de la comunicación extracelular mediada por NO en los NSQ atenúa tanto los adelantos comportamentales fóticos inducidos a CT18, como la distribución ventral-dorsal de la expresión de cFOS en los NSQ; mientras que el mismo tratamiento farmacológico a CT14, no tuvo efecto alguno sobre los retrasos de fase inducidos por luz [177]. A su vez, haciendo uso de la misma herramienta farmacológica, se comprobó que tal fenómeno fase-dependiente también ocurre en protocolos de *jet lag* experimental [178]. Por lo tanto, se asume que el NO, como mensajero gaseoso extracelular, se encuentra solo involucrado en la cascada de transducción de señales para los adelantos de fase. En concordancia con estos resultados previos, los animales tratados con NOMel solo mostraron un aumento en el número de células cFOS-positivas inducidas por luz a CT18, demostrando una activación neuronal similar a la que ocurre cuando se modula la comunicación extracelular mediada por NO.

Por otro lado, la NOMel no mostró efecto potenciador cuando se emplearon pulsos de luz saturante (Fig. 25), si bien incrementó la inducción de cFOS (Fig. 27). Tal como se

mencionó previamente, la inducción de este gen temprano no se encuentra necesariamente correlacionado con la magnitud del cambio de fase [266]. Probablemente, los cambios de fase inducidos por pulsos de luz saturante estén limitados por el propio sistema marcapasos circadiano, alcanzando un techo en la respuesta. Se supone entonces que el incremento en el número de células cFOS-positivas puede deberse a un aumento en la comunicación extracelular mediada por NO, el cual no puede generar un cambio de fase mayor, debido a este efecto de saturación.

Se hipotetiza entonces que la potenciación generada por la NOMel, observada tanto a nivel comportamental como en los resultados inmunhistoquímicos, se debe a un incremento en los niveles de NO. Por lo tanto, para corroborar que este fármaco esté actuando como un verdadero dador de NO, se decidió medir los niveles de nitritos y nitratos (los princiaples metabolitos del NO) en los NSQ luego de la administración de la droga (Fig. 29). La medición de estos metabolitos confirman a la NOMel como un dador eficiente de NO *in vivo*. A su vez, debido a que no se encontraron diferencias en los niveles de estos metabolitos cuando la NOMel fue administrada a CT14 o a CT18 (Fig. 30), se pudo descartar cualquier efecto circadiano sobre la biodisponibilidad de la droga.

Si bien el pulso de luz activa a la NOS a nivel central [150] y la medición *ex vivo* en tejido cerebral de nitritos y nitratos refleja la activación de la NOS *in vivo* [267], la medición de estos metabolitos entre los animales con y sin pulso no arrojó diferencias significativas (Fig. 29).

Analizando en conjunto los resultados, se verificó que la administración de la droga *per se* no logró inducir cambios de fase ni generar activación neuronal, lo cual junto a la medición de nitratos/nitritos, permite confirmar que el sólo incremento en los niveles de NO a nivel central, sin la estimulación fótica, no es suficiente para generar un cambio de fase.

Con el objetivo de determinar el mecanismo por el cual la NOMel modula la cascada fótica en los NSQ, se decidió co-administrar por vía i.c.v. L-NAME, un conocido inhibidor de la NOS [161], junto a NOMel por vía i.p., seguido del LP. Se hipotetiza que

la liberación de NO por NOMel podría sobrepasar la inhibición de la NOS, permitiendo a la cascada de transducción de señales fótica continuar activando los sustratos río abajo de esta enzima, generando así el cambio de fase. Los resultados experimentales confirman tal hipótesis (Fig. 31). Por lo tanto, la NOMel estaría liberando los niveles de NO necesarios para la continuación de la cascada, sin ser capaz de generar un cambio de fase por sí misma, como ya se mencionó. Además, si bien la administración i.p. de la NOMel podría aumentar los niveles de NO en la periferia (mediciones no realizadas), el bloqueo a nivel de los NSQ de la NOS permite confirmar el efecto del fármaco sobre el reloj central.

Por otra parte, se analizó el efecto de la NOMel sobre los cambios de fase inducidos por pulsos "no fóticos", empleando el reemplazo de jaula y viruta durante el día subjetivo como estímulo (Fig. 26 [268, 269]). La administracion de NOMel a CT6 no tuvo efecto sobre los adelantos de fase inducidos por el pulso no fótico, ni tampoco generó un cambio de fase *per se*. Sin embargo, la revisión bibliográfica sobre el tema no permite descartar la participación de la nNOS en este tipo de efectos sobre el reloj circadiano.

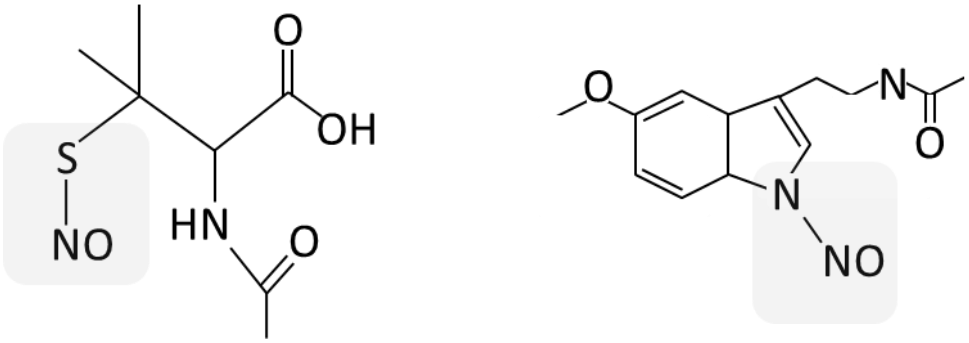
A diferencia de la NOMel, otro dador de NO, la S-nitroso-N-DL-acetilpenicilamina (SNAP), demostró potenciar tanto la vía de adelantos como la de retrasos en los mismos CTs ensayados en esta tesis [159]. Como ya se mencionó en la introducción, la cascada de transducción de señales involucrada en la sincronización fótica diverge río debajo de la nNOS: mientras que la activación de la sGC participa en la cascada de los adelantos, la apertura del RyRII está involucrada en los retrasos. Teniendo en cuenta lo anterior, vale suponer que la NOMel podría estar potenciando la activación de la sGC, mientras que la SNAP podría además promover la apertura del receptor. Efectivamente, SNAP promueve la S-nitrosilación del RyR en otros tejidos, generando su apertura [270, 271]. La capacidad S-nitrosilativa de la NOMel ha sido solo comprobada en estudios *in vitro* [272], pero no *in vivo*. Por otra parte, una importante diferencia entre los dos mecanismos *downstream* de la nNOS es la sensibilidad al NO: mientras que la sGC es activada por concentraciones en el rango nanomolar del NO [273-275]; la S-nitrosilación es considerado un mecanismo local que requiere de altas concrentaciones [276, 277]. Sin embargo, la NOMel no tuvo efecto potenciador de los

retrasos de fase inducidos por luz incluso cuando se usó una concentración 10x (Fig. 24). Se hipotetiza entonces que la diferencia entre los efectos generados por SNAP y NOMel pueda deberse a la propia estructura química de estos compuestos. Esto es, al ser SNAP un pequeño S-nitrosotiol [278], su grupo -NO se encuentra unido al resto de la molécula a través de un átomo de azufre (Fig. 33, izquierda). Por lo tanto, puede hipotetizarse una trans-S-nitrosilación [279, 280] del receptor, en donde SNAP cede su grupo nitro a los tioles blancos del receptor, proceso similar al explicado para el sistema del glutatión y de las tioredoxinas [281]. En cambio, la NOMel carecería de tal capacidad trans-S-nitrosilativa debido a que su grupo nitroso se encuentra unido a través de una unión nitrógeno-nitrógeno con la melatonina (Fig. 33, derecha [282]). De esta manera, la liberación de NO por parte de NOMel potenciaría la comunicación extracelular mediante este gas en los NSQ incrementando los adelantos de fase, mientras que su inacción sobre los retrasos podría deberse a su pobre capacidad trans-S-nitrosilativa.

Para concluir, hemos ensayado las propiedas cronobióticas de la NOMel de manera pre-clínica, obteniendo resultados promisorios en la modulación de la vía de los adelantos de fase. Los estudios descriptos en este capítulo son los primeros ensayos *in vivo* en los que se comprueba la capacidad de la NOMel como un dador de NO en los NSQ. Se propone entonces a esta droga como un potencial cronobiótico a ser evaluado para el tratamiento de diferentes tipos de trastornos circadianos que afecten a la salud humana, tales como aquellos que ocurren asociados a los turnos rotativos, o durante el jet lag. En este sentido, la melatonina ya ha demostrado ser efectiva en el tratamiento y prevención del *jet lag* en ensayos con humanos [283, 284]. A diferencia del tratamiento continuo requerido para la melatonina, la administración aguda de su versión nitrosilada ensayada en esta tesis permite hipotetizar un futuro prometedor para el tratamiendo de alteraciones circadianas por NOMel.

Con el fin de establecer el motivo de la acción diferencial de los agentes oxidantes NOMel y SNAP sobre la sincronización fótica de los ritmos circadianos en mamíferos, se postula ampliar la experimentación con NO. En el Capitulo 2 se muestran los resultados de dos tipos de agentes oxidantes con propiedades diferentes: NO radical

(●NO) o nitroxil (NO^-); contrastando con la modulación dada por agentes anti-oxidantes



S-nitroso-N-DL-acetilpenicilamina N-nitrosomelatonina

Figura 33. Estructuras químicas de la N-nitrosomelatonina y la S-nitroso-N-DL-acetilpenicilamina. Se detallan las estructuras de SNAP (izquierda) y NOMel (derecha), resaltando en gris la unión del grupo nitro (-NO) en cada caso.

CAPITULO 2.

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD CRONOBIÓTICA DE OTROS DADORES NITRÉRGICOS CON CARACTERÍSTICAS DE S-NITROSOTIOLES. MODULACIÓN FÓTICA REDOX.

INTRODUCCIÓN.

En el anterior capítulo, se puso en evidencia una herramienta farmacológica que permitió potenciar el proceso de adelantar la fase del reloj circadiano, sin tener efecto en los retrasos. Se explicitó, además, una crucial diferencia respecto al único dador de NO usado *in vivo* en protocolos de sincronización circadiana fótica hasta el momento (SNAP), diferencia posiblemente asociada a una capacidad distinta de estos dadores de NO para promover la vía clásica dependiente de cGMP (adelantos), o una vía independiente de este segundo mensajero (retrasos, S-nitrosilaciones). Debido a que la oxidación de cisteína es considerado una modificación post-traduccional redox dependiente, se proponen entonces que la bifurcación de la cascada de transducción de señales podría deberse a una modulación del ritmo circadiano redox sobre la cascada de transducción de señales.

En este capítulo se pondrá en evidencia el ritmo redox en los NSQ del hámster, se mostrarán además los resultados comportamentales obtenidos con diferentes agentes antioxidantes, y se ampliará la comprensión de la comunicación nitrérgica haciendo uso de otros dadores de NO. Tales resultados permitirán elaborar una hipótesis sobre el mecanismos molecular que conlleva a la bifurcación de la cascada. Pero primero, es necesario realizar una introducción extendida para describir a la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), con actividad diferente en la vía de adelantos (dependiente de cGMP) o retrasos (independiente de cGMP, S-nitrosilaciones), para comprender cómo pueden estar actuando los moduladores farmacológicos empleados.

La Óxido Nítrico Sintasa.

En los mamíferos, el NO puede ser generado por tres isoformas diferentes de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Estas isoformas se encuentran referidas como la versión neuronal (nNOS o NOS I), inducible (iNOS o NOS II) o endotelial (eNOS o NOS III). Todas las isoformas utilizan a la L-arginina como sustrato, al oxígeno molecular y NADPH como co-substratos, y flavin adenina dinucleótido (FAD), flavin mononucléotido (FMN) y tetrabiopterina (BH4) como cofactores. Todas las proteínas NOS son homodímeros, donde cada uno de los monómeros contiene un dominio

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

reductasa carboxi-terminal y un dominio oxidasa amino-terminal. El dominio reductasa recibe el poder reductor aportado por NADPH, cuyos electrones se transfieren vía FAD y FMN al grupo hemo del sito activo en el dominio oxigenasa. En el grupo hemo se produce la oxidación de L-arginina a L-citrulina y la liberación de NO [285]. Todas las isoformas se unen a calmodulina, y en particular para nNOS y eNOS, tal unión ocurre como respuesta a un incremento en la $[Ca2+]_i$, que facilita la transferencia electrónica entre los dominios; sin embargo, iNOS es considerada $[Ca2+]_i$-independiente para su activación, al ser esta enzima inducible a nivel transcripcional por cascadas de respuestas inmunológicas [286]. La unión de calmodulina a iNOS ya ocurre a la $[Ca2+]_i$ basal, debido a una diferencia en la estructura aminoacídica en el sitio de unión a calmodulina [287, 288]. Todas las isoformas contienen un sitio tetratiolato de zinc cuando se homodimerizan; en otras palabras, un átomo de zinc se encuentra tetraédricamente coordinando dos motivos CysXXXXCys (cada uno aportado por cada monómero) en la interface del dímero de NOS, promoviendo su estabilización estructural ([289, 290] Fig. 34).

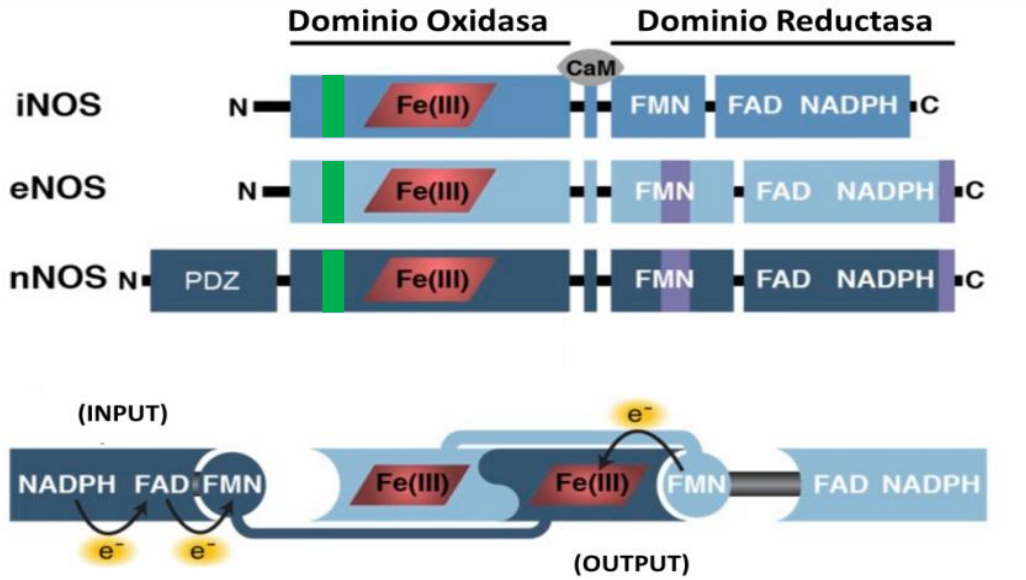


Figura 34. Óxido Nítrico Sintasa de mamíferos. A. Organización de los dominios de NOS. Cada monómero de NOS está compuesto por dos dominios: el amino-terminal oxidasa y el carboxi-terminal reductasa. EL cofactor hemo (en rojo) se une al dominio oxidasa próximo al sitio de tetratiolato de zinc (en verde). El dominio reductasa se encuentra dividido en los sitios de unión a FAD/NADPH y FMN. La Calmodulina (CaM) se posiciona en un pequeño segmento helicoidal que une al dominio reductasa con

el dominio oxidasa. A pesar de su semejanzas, cada isoforma de NOS posee características particulares. iNOS es la más pequeña (260kDa para el dímero sin CaM) y no posee la hélice auto inhibitoria dentro de la región FMN ni la extendida cola C-terminal (ambas mostradas en violeta), presentes en eNOS y nNOS. La isoforma eNOS posee un peso molecular de 266kDa para el homodímero, y nNOS es el más grande de todos con 321kDa para el homodímero, como resultado de su extendida región N-terminal comprendida por unos 250 aminoácidos que conforman el dominio PDZ. B. Se esquematiza la transferencia electrónica en un homodímero de NOS [Figura modificada de [291].

La vía no-clásica de la NOS (independiente de cGMP), está mediada por la formación de S-nitrosotioles en un sitio de unión a GSH, el cual se encuentra próxima a la región tetratiolato de zinc [292]. Además, el canal hidrofóbico intramolecular posteriormente descripto entre el sitio activo de la enzima con el tetratiolato [293], permite suponer una síntesis controlada del NO, requiriendo la previa S-nitrosilación de las cisteínas involucradas en la coordinación del átomo de zinc [294]. Tal versión dimérica S-nitrosilada de la NOS promueve la síntesis de Glutatión-S-nitrosilado (GSNO) a través de un mecanismo de trans-S-nitrosilación (Fig. 35) [295].

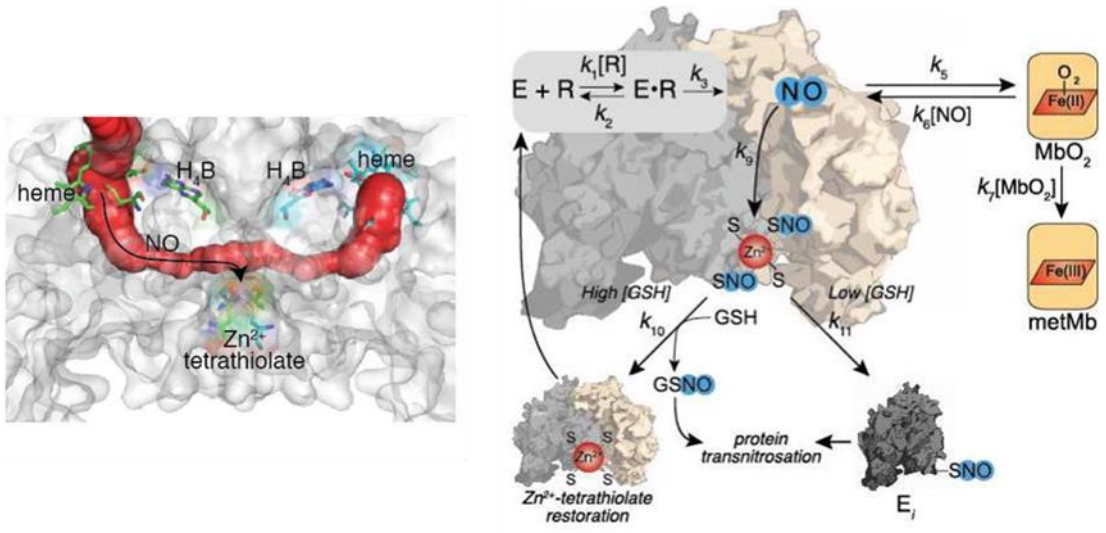


Figura 35. Dependencia de la NOS por GSH. En A. se muestra el dominio de tetratiolato de zinc en la interface del dímero de NOS, y se resalta con rojo el potencial canal hidrofóbico intramolecular comunicando esta región con el hemo del sitio activo[293]. Modelo resumido de la auto-inactivación de iNOS a través de la S-nitrosilación del tetratiolato de zinc y la protección a la inactivación dada por el agente reductor glutatión reducido (GSH) propuesto por [295].

De esta manera, la comprensión actualizada sobre el rol de la NOS en la vía no clásica del NO [296] tiene como premisa la proximidad de los sustratos para la activación de cascadas de trans-S-nitrosilación (Fig. 36 [297]); sin embargo, GSNO ha sido detectado tanto intra- como extracelularmente [298, 299]. El modelo propuesto por el grupo de Martínez-Ruiz, ha sido recientemente corroborado por ensayos de liberación controlada tópicamente de NO por parte de GSNO, donde el GSSG resultante queda retenido en un hidrogel, pero el NO gaseoso puede activar la vía clásica de sGC en la piel [300]. El modelo también explicaría el posicionamiento de nNOS tanto en la pre o post-sinapsis de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas [301, 302].

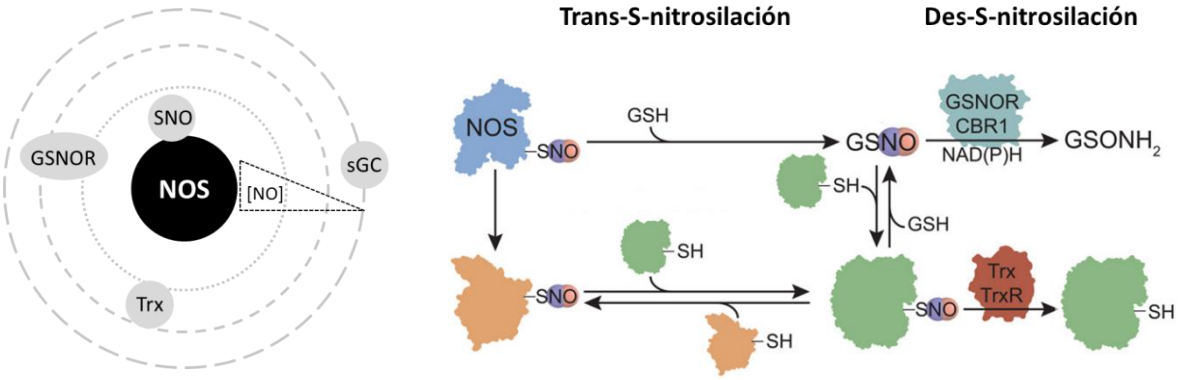


Figura 36. Cascada de señalización del NO rango-dependiente. La cascada clásica del NO, tal como la activación de sGC, puede ser realizada incluso a largas distancias desde el sitio de origen (NOS), a pesar que la concentración de NO disminuya a medida que se aleja de NOS. Se postula que las proteínas target a las S-nitrosilaciones (SNO) se basan esencialmente en un mecanismo a corta distancia, limitada a una región cercana a la NOS. Este modelo posiciona en las cercanías de la NOS a los sistemas des-S-nitrosiladores tioredoxinas (Trx) y S-nitrosoglutatión reductasa [GSNOR, figura modificada de [295].

Resulta crucial entonces comprender la localización de la nNOS para comprender el rol fisiológico de la vía tanto clásica (dependiente de cGMP) como no clásica del NO. En este sentido, esta enzima posee tres variantes por *splicing* alternativo: la versión alfa, beta y gama. La variante α-nNOS es la única que posee el dominio PDZ la cual le permite interactuar con el dominio PDZ de la proteína adaptadora PSD95 (posicionándola en la post-sinapsis próxima a los receptores NMDA [303] [304]), o con

el dominio PDZ de CAPON (posicionándola en el citosol, Fig. 37 [305]). De las otras versiones, solo β-nNOS ha sido descripta en algunas regiones del cerebro, como el estriado [306] .

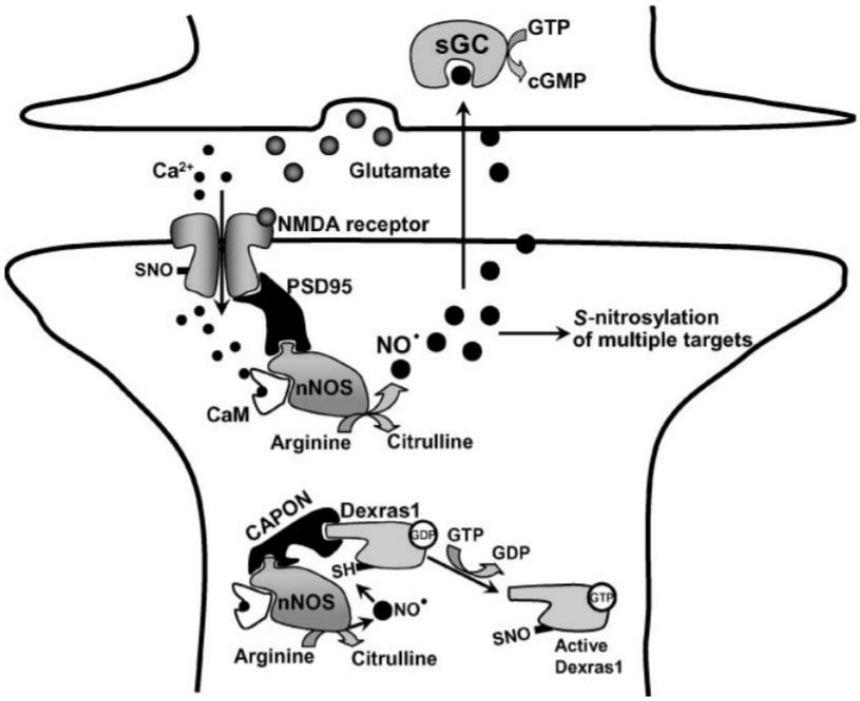


Figure 37. Regulación de la cascada de señalización de nNOS por proteínas adaptadoras. nNOS se encuentra localizada cercana a los receptores NMDA a través de la proteína adaptadora PSD95. La entrada de calcio a través del receptor NMDA activa a la nNOS por el mecanismo dependiente calcio/calmodulina. El neurotransmisor gaseoso puede entonces difundir a neuronas vecinas para activar la guanilato ciclasa soluble [sGC, en la figura es un ejemplo de la acción retrógrada del NO] o generar modificaciones por S-nitrosilación. La propia S-nitrosilación del receptor NMDA inhibe su actividad, conformando un mecanismo de retroalimentación negativa [307]. CAPON compite con PSD95 por el dominio PDZ en el extremo N-terminal de nNOS [308], reclutándola a la pequeña proteína-G Dexras1 activándola por S-nitrosilación [309]. Figura tomada de [303].

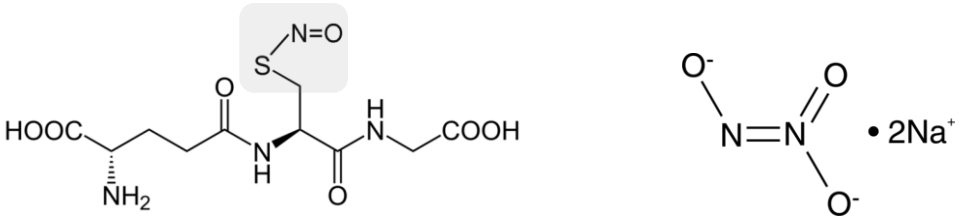
El nitroxil (NO^-) como un posible mensajero fótico.

Si bien hasta aquí se ha hablado del óxido nítrico gaseoso radical (●NO), éste no es el único mensajero gaseoso potencialmente producido por la NOS, siendo el nitroxil (NO^-) producido en condiciones particulares *in vitro* [baja concentración del cofactor BH4 o por reacción secundaria con peroxinitritos [310]]. El NO^- ha sido descripto por químicos

hace ya más de 100 años [311], y presenta propiedades farmacológicas prometedoras para el tratamiento terapéutico de afecciones cardiovasculares, cuando se lo compara con dadores del tipo radical [312, 313]. Una característica distintiva del NO^- radica en la alta afinidad que posee por los tioles [314]. De hecho, se han estudiado sus propiedades terapéuticas cardiovasculares a través de la liberación del péptido vasodilatador CGRP (*calcitonin gene related peptide* [315]) por S-nitrosilación del receptor TRPV1 [316]. Por lo tanto, mientras los dadores de ●NO generan vasodilatación vía cGMP, dadores de NO^- como la Sal de Angeli la generan además liberando CGRP. A su vez, este péptido vasodilatador es liberado por las terminales nerviosas en la vía de la nocicepción, existiendo el estudio de antagonistas en fase clínica para el tratamiento de migrañas [317, 318].

Modulación del óxido nítrico sobre la sincronización fótica.

En el presente capítulo, se evaluará entonces la capacidad cronobiótica del GSNO, un potencial mensajero redox-dependiente de la nNOS con comprobada acción como dador de ●NO [319], pero además con capacidad para trans-S-nitrosilar [280] (Fig. 38). También se ensayará la acción de Sal de Angeli, un dador típico de NO^- [320], que es capaz de inducir la apertura del RyRII *in vitro* [321, 322] y activar sGC [323], pero del cual no existen evidencias de su acción sobre los ritmos circadianos.



S-nitrosoglutatión Sal de Angeli

Figura 38. Estructuras químicas del S-nitrosoglutatión (GSNO) y Sal de Angeli. Se resalta en gris la unión tiol-S-nitrosilado.

Modulación del estado redox sobre la sincronización fótica.

Finalmente, se evaluará la modulación de la sincronización fótica de los ritmos circadianos por modificación del estado redox en los NSQ. Se estudiará la acción de agentes antioxidantes, por administración i.c.v. de glutatión reducido (GSH) como de L-acetil-N-cisteína (LNAC, un agente antioxidante precursor de la biosíntesis de GSH [324]). Brevemente, LNAC es un agente utilizado como mucolítico [325] de venta comercial [324] cuyo tratamiento prolongado en pacientes con obstrucción pulmonar crónica disminuye los eventos de exacerbación [326]. Además, se encuentra indicado en caso de intoxicación con paracetamol [327], y posee propiedades anti-inflamatorias [328] y gastro-protectoras [328]. Por otro lado, el estudio de los efectos de agentes oxidantes no nitrérgicos (GSSG, Diamida) no pudo realizarse, debido a que se obtuvieron efectos deletéreos sobre los ritmos de actividad locomotora (datos no mostrados).

HIPÓTESIS.

1. La modificación del estado redox en los núcleos supraquiasmáticos modula la actividad del reloj circadiano y su sensibilidad a la luz.

2. La sincronización fótica es modulada en la bifurcación entre retrasos y adelantos de fase por agentes nitrérgicos con distinta tiofilicidad

OBJETIVOS.

1. Comprobar el efecto de la administración central de agentes oxidantes y antioxidantes, sobre el ritmo circadiano de actividad locomotora en rueda del hámster y su sincronización por pulsos de luz.

2. Evaluar efectos diferenciales sobre la vía de retrasos y de adelantos de mensajeros fóticos nitrérgicos con distinta tiofilicidad, nitroxil (NO^-) y óxido nítrico radical (●NO).

3. Generar un modelo conceptual sobre la interacción entre el oscilador redox y el oscilador circadiano canónico en los NSQ.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

Drogas y tratamientos.

El glutatión reducido (GSH), glutatión-S-nitrosilado (GSNO) y la L-acetil-N-cisteína (LNAC) fueron adquiridos de Sigma Aldrich®; la Sal de Angeli (AS) fue sintetizada como está descripto en la literatura [329]. Toda manipulación de los fármacos fue realizada en frío y las soluciones preparadas en el momento de la inyección.

Animales y cirugía.

Se emplearon hámsters siberianos (*Mesocricetus auratus*) machos adultos (3-4 meses de edad) mantenidos bajo un ciclo de 14h luz: 10h de oscuridad [(14:10 LO), hora reloj de apagado de las luces 20.00], con un promedio de 200 lux a nivel del sustrato de las jaulas, temperatura controlada a 20 ± 2°C, recibiendo alimento y agua *ad libitum*. Los animales mantenidos en condiciones de oscuridad constante, fueron siempre manipulados bajo luz roja <5lux.

Para aquellos experimentos dónde se requirieron administraciones intracerebroventriculares (i.c.v.), se implantaron cánulas de acero inoxidable bajo anestesia, tal como fuera explicado en la sección *Materiales y métodos* del Capítulo 1.

Experimentos comportamentales.

Para los experimentos de pulsos de luz, se siguió el protocolo ya descripto anteriormente. Los animales mantenidos en oscuridad constante (OO) recibieron una única inyección i.c.v. de GSH, GSNO, AS, o de LNAC, 5 min antes de un pulso de luz (condiciones sub-saturantes o saturantes, CT14 o CT18, dependiendo del caso). Para el caso del experimento de re-sincronización a un jet lag experimental, se realizó el cambio del ciclo de luz oscuridad por un protocolo de "día largo" (ver Capítulo 1, sección *Materiales y métodos*, pág. 59). La inyección intraperitoneal de 100mg/kg de LNAC fue dada a ZT14 en el día del cambio. La dosis utilizada se tomó de experimentos similares [330-332].

Medición del par redox Glutatión reducido - oxidado.

Para la medición de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG), se utilizó el *kit* comercial GSH/GSSG *Ratio Detection Assay Kit* (*Fluorometric – Green*) de Abcam®, que presentar una sensibilidad (10nM) adecuada para la concentración de glutatión esperada (1mM [333, 334]); y se procedió como indican las instrucciones del fabricante. Brevemente, un grupo de hámsters fue sometido a un protocolo de Aschoff tipo II (ver Capítulo 1, sección *Materiales y Métodos*, pág. 64 [2]). Los animales fueron sacrificados por decapitación bajo anestesia profunda en cada CT, sus cerebros fueron congelados inmediatamente en nitrógeno, se realizó un corte coronal de 1mm de espesor a la altura del quiasma óptico y se extrajo un *punch* de la región de los núcleos supraquiasmáticos. Para obtener una medición confiable, se procedió a homogeneizar dos *punches* (correspondientes a dos animales), de modo que un n=1 corresponde a la medición de 1 *pool* de 2 cerebros. Los valores obtenidos fueron expresados en proporción a la concentración de proteína total de cada muestra, determinada por el método de Bradford.

Inmunohistoquímicas.

Un grupo de hámsters fue sometido a un protocolo de Aschoff Tipo II (ver Capítulo 1, sección *Materiales y métodos*, pag. 59 [262]), recibiendo por vía i.p. 100mg/kg de L-acetil-N-cisteína, o vehículo a CT14. Luego de 3 horas post-inyección, los animales fueron profundamente anestesiados con isoflurano y perfundidos intracardiacamente con buffer fosfato salino 0.01M (PBS), seguido de la solución fijadora (4% p/v paraformaldehído en 0.1M de buffer fosfato, pH 7.4). Los cerebros fueron disecados, post-fijados durante una noche a 4° en la misma solución de fijado, criopreservados en una solución al 30% de sacarosa en PBS por 24h, y congelados a -80° C por al menos un día. Se obtuvieron cortes coronales (20 µm de grosor) con un criostato, y se colectaron en PBS 0.01M. Las secciones fueron divididas en dos grupos, de modo tal que cortes del mismo cerebro fueran reveladas por:

- Inmunofluorescencia: Los cortes fueron montados en vidrios positivizados, lavados con primero con 0.3% Tritón X-100 en 0.1M PB (0.3% PBT) y luego con

0.03% Tritón X-100 en 0.1M PB (0.03% PBT). Las uniones no específicas fueron bloqueadas con 10% de leche descremada en PBT por 1h a temperatura ambiente. Luego los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario PER1 (Abcam ® ab3443) en un dilución 1.200 en 0.03% PBT por 48h a 4° C. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario *Donkey anti-Rabbit* IgG (H+L), Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher Scientific®, A10042) diluido 1:200 en PBST, por 1h a temperatura ambiente. Luego de lavados con 0.03% PBT y PBS, se colocaron 2 gotas de VECTASHIELD *Antifade Mounting Medium* con DAPI (Vector Laboratories®, H-1200) y se sellaron cubriendo con un cubreobjetos.

- Inmunohistoquímica. Otro grupo de cortes coronales, fue lavado con 0.4% Tritón X-100 en 0.01M PBS (PBST). Las uniones no específicas fueron bloqueadas con 2% suero normal de caballo y 5% de leche descremada en PBST por 1.5h a temperatura ambiente. Luego, los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario anti-PER1 (Abcam ® ab3443) a un dilución 1.200 en PBST por 24h a 4° C. Luego se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón/conejo IgG (H+L) hecho en caballo (Vector Laboratories) diluido 1:200 en PBST por 2h a temperatura ambiente. La reacción fue amplificada con el complejo avidina-biotina y visualizada con el sustrato cromógeno VIP (Vectastatin Elite ABC kit, Vector Laboratories).

Medición del par redox Glutatión reducido/oxidado en los NSQ

La medición fluorométrica del par redox glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en muestras de los NSQ del hámster (Fig. 39), muestra un aumento de la especie oxidada (es decir, una disminución de la tasa GSH/GSSG) en la noche tardía (CT18) tanto respecto a la noche temprana (CT14), como a la mitad del día subjetivo (CT6). No se hallaron diferencias significativas entre CT6 y CT14.

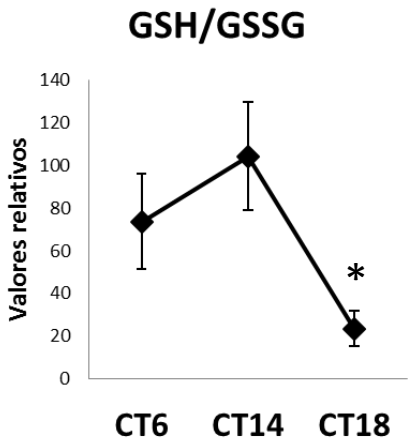


Figura 39. Medición de Glutatión reducido/oxidado en los NSQ. Se muestra la media ± SEM de la tasa GSH/GSSG obtenida durante la mitad del día subjetivo (CT6), noche temprana (CT14) o tardía (CT18). ANOVA de una vía, seguido de Bartlett post-test CT18 vs. CT14 y CT18 vs. CT6 *$p<0.05$; n= 6 para CT14 y CT18, n= 8 para CT6. Valores relativizados a la concentración de proteína de cada muestra.

Efecto del agente antioxidante L-acetil-N-cisteína sobre los cambios de fase inducidos por luz.

Todos los pulsos de luz, tanto a CT14 como a CT18, generaron los correspondientes cambios de fase, retrasos o adelantos, respectivamente [Fig. 40 (ANOVA de dos vías, para LP $p<0.001$)]. El tratamiento i.c.v. con L-acetil-N-cisteína previo al pulso de luz (LNAC+LP) atenuó el cambio de fase inducido por luz a ambos CTs. Por otro lado se observó que el grupo que recibió el tratamiento central con el agente antioxidante en la noche temprana (CT14), pero sin el LP, mostró un retraso de fase significativo.

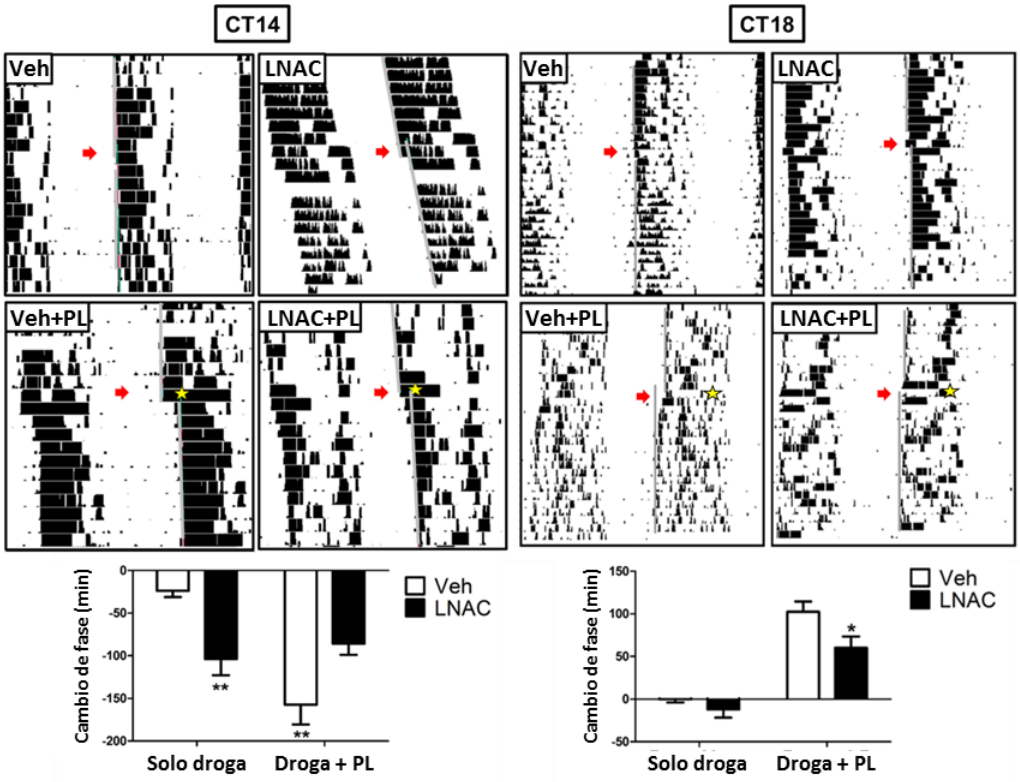


Figure 40. Efecto de la N-acetil-L-cisteína sobre los cambios de fase del ritmo de actividad locomotora. Actogramas representativos en gráfico doble mostrando el ritmo de actividad locomotora en condiciones de oscuridad constante, de hamsters tratados i.c.v. con vehículo (Veh) o 100 µM de N-acetil-L-cisteína (LNAC), 5 min antes del pulso de luz (PL) saturante (10min, 300lux) a la hora circadiana (CT) 14 (a., panel izquierdo) o CT18 (b., panel derecho). Los animales control solo recibieron el tratamiento farmacológico sin el estímulo lumínico (grupo "*Solo droga*"). El día del tratamiento está indicado con una flecha. La estimulación lumínica se indica con una estrella. El comienzo de la actividad se encuentra indicado por líneas derechas trazadas sobre los actogramas, indicando la fase del ritmo. Se muestra la media ± SEM de los cambios de fase (ANOVA de dos vía, seguido Bonferroni post-test, para CT14: LNAC+LP vs. Veh+LP y LNAC vs. Veh** $p<0.01$, n=7 para Veh, Veh+LP y LNAC, n=8 para LNAC+LP; para CT18: *$p<0.05$, n=6 para Veh, n= 7 para LNAC+LP, n=8 para Veh+LP, n= 10 para LNAC).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

Efecto de la L-acetil-N-cisteína sobre la re-sincronización a un jet-lag experimental.

Se analizó el efecto del agente antioxidante LNAC sobre la re-sincronización del ritmo de actividad locomotora en rueda, en un protocolo de jet lag por retrasos de 6 h en el ciclo LO. Al comparar con los controles, el tratamiento i.p. con LNAC a ZT14 disminuyó casi hasta la mitad el número de días para re-sincronizar al nuevo ciclo LO (Fig. 41).

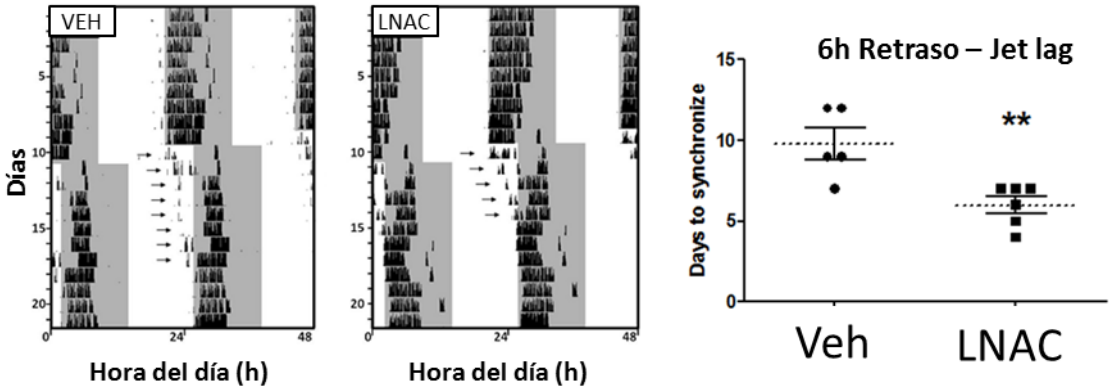


Figura 41. Efecto de la L-acetil-N-cisteína sobre la re-sincronización por retrasos a un jet lag. Actogramas representativos en formato de doble gráfica indicando la re-sincronización del ritmo de actividad locomotora del hámster luego de un retraso de 6h en el ciclo LO, tratados i.p. con vehículo (Veh, actograma izquierdo) o L-acetil-N-cisteína (LNAC, actograma derecho) 100mg/Kg. Las áreas sombreadas indican la fase de oscuridad. Las flechas indican los días que tarda en re-sincronizarse el ritmo de actividad, siendo las inyecciones administradas en el día del cambio del ciclo LO a ZT14. Se muestra para ambos grupos la media ± SEM de los días necesarios para re-sincronizar al nuevo ciclo LO (ANOVA de una vía, seguido de Tukey Test: LNAC vs. Veh **p<0.001; Veh n=5, LNAC n=6).

Efecto de la L-acetil-N-cisteína en la inducción de PER1 en el reloj central.

Se realizó un experimento preliminar para verificar el efecto sincronizador de la LNAC en los NSQ del hámster. Se utilizaron 2 animales controles (vehículos) y 2 animales tratados por vía i.p. con LNAC (100mg/kg). Si bien el número de muestras por grupo es muy bajo para poder establecer significancia, puede observarse una mayor inducción de PER1 en los animales tratados con LNAC (Fig. 42).

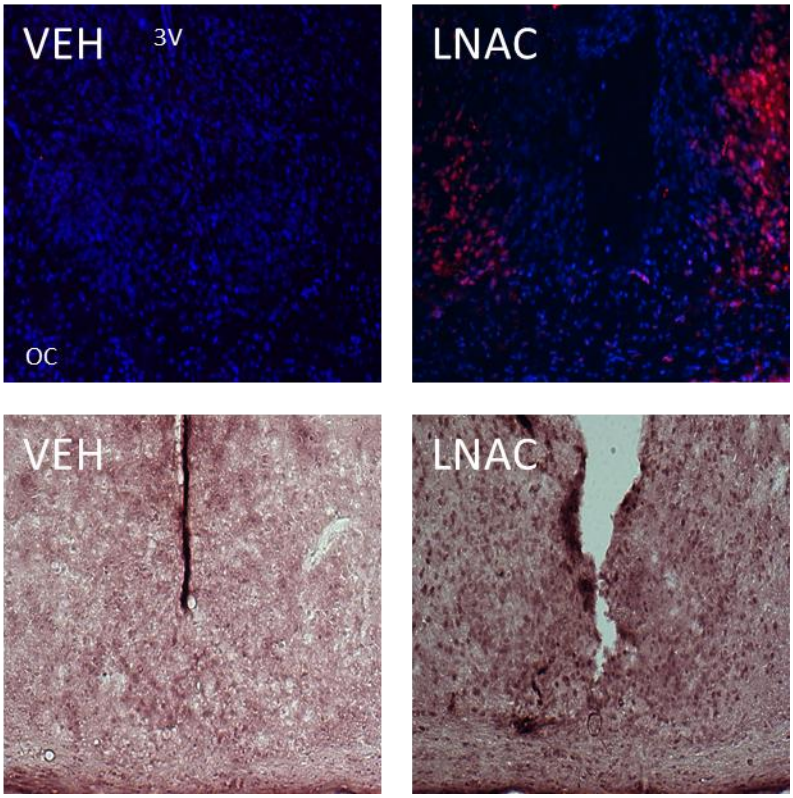


Figura 42. Efecto de L-acetil-N-cisteína sobre la inducción de PER1 en los NSQ. Se muestran cortes coronales de cerebros de hámsters conteniendo los NSQ, que fueron reaccionados por inmunofuorescencia (panel superior) o por inmunohistoquímica (panel inferior) para anti-PER1 ab3443 Abcam®). El número de muestras (n=2) para cada grupo no permite realizar el análisis estadístico de los resultados. Se muestran las fotos para 4 cortes de un mismo cerebro, equivalentes respecto a la posición antero-posterior de los NSQ.

Efecto del glutatión reducido y del glutatión-S-nitrosilado sobre los cambios de fase inducidos por luz.

Independientemente del CT, la inyección i.c.v. del dador de NO S-nitrosoglutatión (GSNO) previo al LP sub-saturante potenció el cambio de fase resultante, comparado con los grupos controles [vehículo (Veh+LP) y glutatión reducido (GSH+LP), Fig. 43]. El tratamiento con el agente antioxidante GSH no generó diferencias significativas en los cambios de fase, a los CTs analizados. Por otro lado, el mismo tratamiento farmacológico con GSH, pero sin el estímulo lumínico, generó un retraso de fase a CT14 (Fig. 43 a., GSH alone)

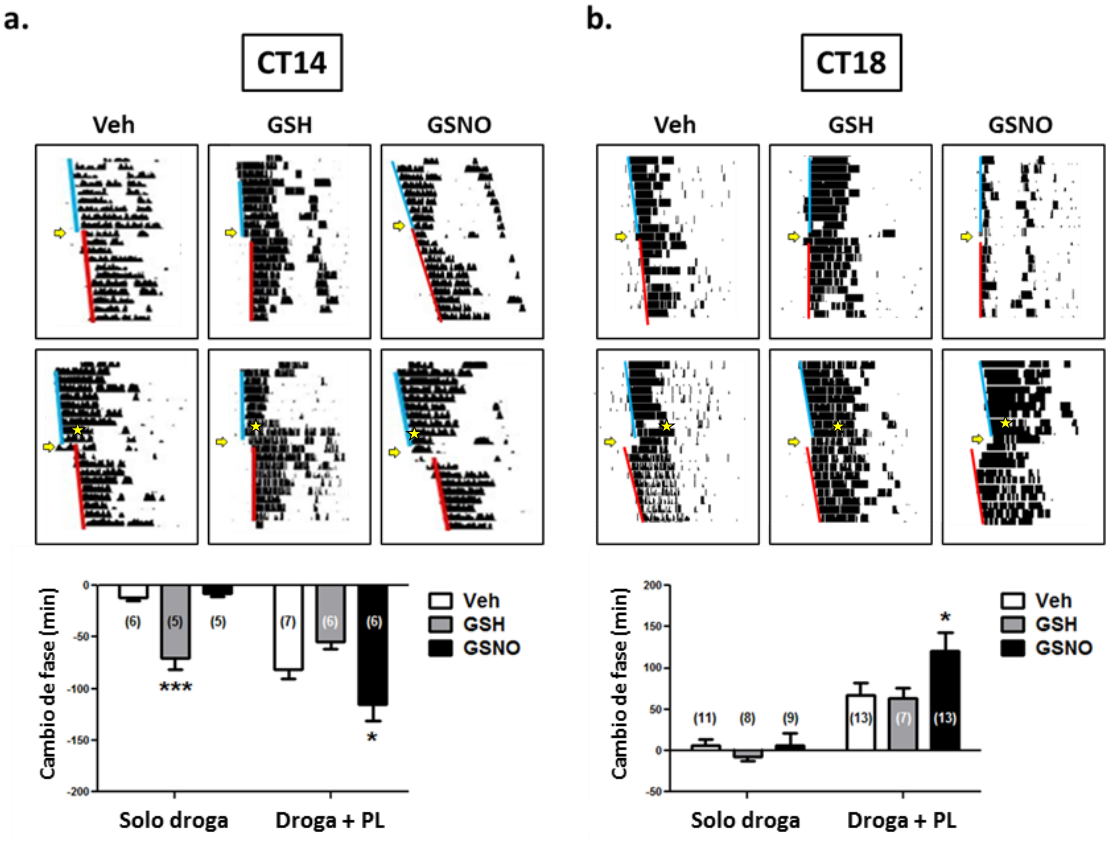


Figura 43. Efecto del glutatión reducido (GSH) y su versión S-nitrosilada (GSNO) sobre los cambios de fases inducidos por luz. Actogramas representativos en formato gráfico simple mostrando el ritmo de actividad locomotora de hamsters en condiciones de oscuridad constante tratados i.c.v. con vehículo (Veh), 100 µM GSH o 100 µM GSNO 5 min antes de un pulso de luz (LP) sub-saturante (10min, 50lux) a la hora circadiana (CT) 18. Los animales control solo recibieron el tratamiento farmacológico sin el estímulo lumínico (grupo "*Solo droga*", actogramas superiores). El día del tratamiento está indicado con una flecha. La estimulación lumínica se indica con una estrella. El comienzo de la actividad se encuentra indicado por líneas derechas trazadas sobre los actogramas, definiendo la fase del ritmo. Se muestran la

media ± SEM de los cambios de fase (Para CT14: ANOVA de dos vías, seguido de Bonferroni post-test: GSNO+PL vs. Veh+PL *p<0.05, GSNO+PL vs. GSH+PL p<0.001, GSH vs. Veh y GSH vs. GSNO *** p<0.001; para CT18: ANOVA de dos vías, seguido de Bonferroni post-test: GSNO+PL vs. GSH+PL y GSNO+PL vs. Veh+PL *p<0.05; el número de animales para cada grupo se indican entre paréntesis).

Efecto del dador de nitroxil, Sal de Angeli, sobre los cambios de fase inducidos por luz.

La administración i.c.v. de Sal de Angeli (AS), un dador de nitroxil (HNO), previo al pulso de luz sub-saturante a CT18, potenció los adelantos de fase inducidos por luz, comparando con los controles (Veh+LP). Sin embargo, el mismo tratamiento farmacológico pero a CT14, no tuvo efecto sobre el retraso de fase inducido por el pulso (Fig. 44). A su vez, el tratamiento con AS sin el estímulo lumínico generó un retraso de fase significativo a CT14, no mostrando efecto a CT18.

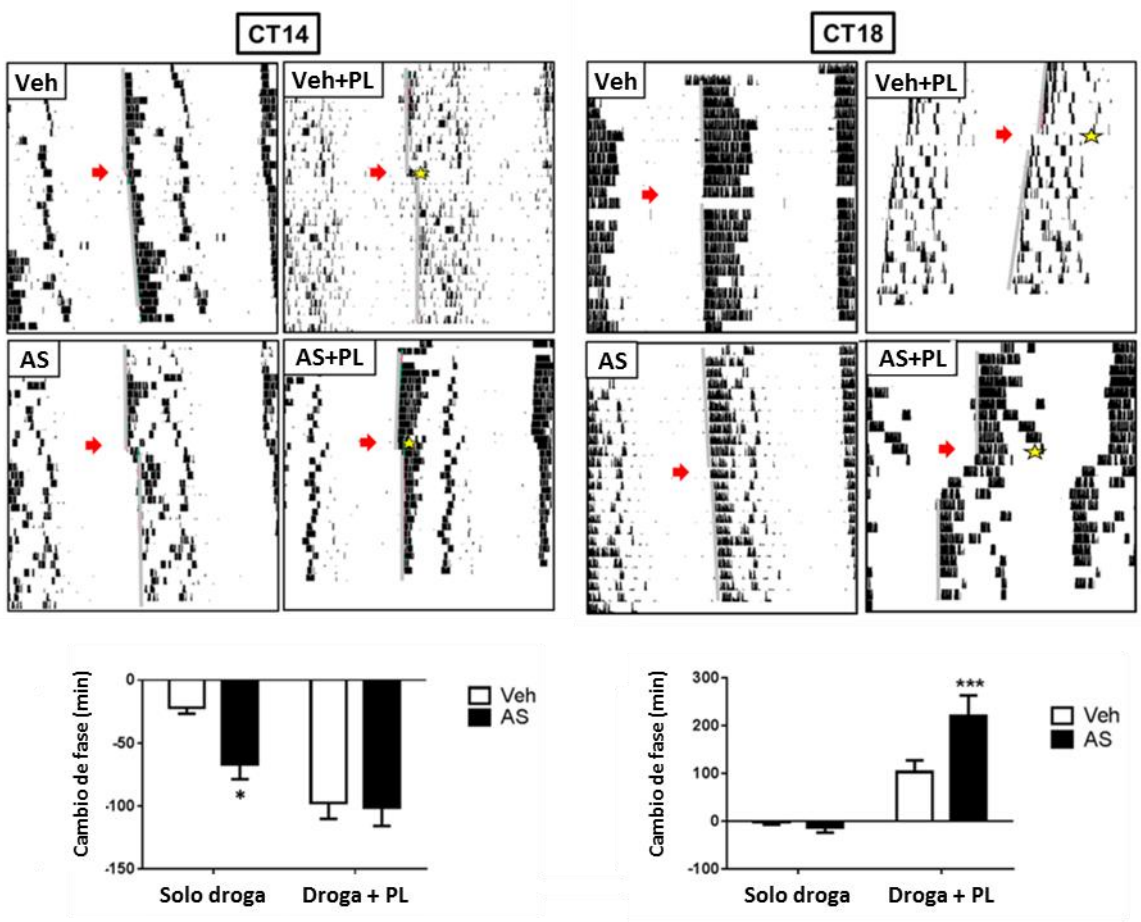


Figura 44. Efecto de la Sal de Angeli sobre los cambios de fase inducidos por luz. Actogramas representativos en formato de gráfico doble mostrando el ritmo de actividad locomotora de hamsters en condiciones de oscuridad constante tratados i.c.v. con vehículo (Veh) o 100 µM Sal de Angeli (AS), 5min antes de un pulso de luz (PL) sub-saturante (10min, 50lux) a la hora circadiana (CT) a. 18 (panel izquierdo) o b. CT14 (panel derecho). Los animales control solo recibieron el tratamiento farmacológico sin el estímulo lumínico (grupo "*Solo droga*"). El día del tratamiento está indicado con una flecha. La estimulación lumínica se indica con una estrella. El comienzo de la actividad se encuentra indicado por líneas derechas trazadas sobre los actogramas, definiendo la fase del ritmo. Se muestran la media ± SEM

de los cambios de fase (ANOVA de dos vías, seguido de Bonferroni post-test, para CT18: AS+PL vs. Veh+PL ***p<0.001, Veh n=4, Veh+PL y AS+PL n=5, AS n= 7; para CT14: *p<0.05, Veh n=9, AS+PL n=7, Veh+PL y AS n=5).

Además, para verificar la liberación de HNO a nivel de los NSQ por la administración intracerebroventricular de SA, realizamos su medición electroquímica *in vivo* en simultáneo a la administración de la droga [335]. Se observó un incremento dosis dependiente de la concentración de HNO (datos no mostrados), comprobando la acción de esta droga *in vivo* en los NSQ.

DISCUSIÓN

En el presente capítulo se estudió la sincronización fótica haciendo uso de agentes antioxidantes (LNAC, GSH) y dadores de óxido nítrico del tipo radical (GSNO) o nitroxil (SA), con el objetivo experimental de modular el efecto de la luz.

A pesar de que la LNAC difunde a través de la membrana celular [336], su paso por la barrera hematoencefálica se encuentra aún bajo discusión [337, 338]. Es por ello que se realizó la administración intracerebroventricular (i.c.v.) obteniendo de esta manera conclusiones más certeras sobre el efecto del fármaco en el reloj central. A su vez, ensayos intraperitoneales (i.p.) permiten analizar el efecto periférico de las drogas, cuando tal hipótesis se encuentra bajo evaluación.

Independientemente de la hora circadiana (CT), la administración i.c.v. de LNAC previo al pulso de luz disminuyó los cambios de fase fóticos (Fig. 40). Una posible explicación a lo observado reside en la capacidad de la LNAC para actuar como un secuestrador intracelular de óxido nítrico (NO), proceso que requiere de la auto-oxidación de este gas di-atómico [339-341]. Otra posibilidad, recae en su accionar como agente des-S-nitrosilador [342-344]. En este sentido, no solo la des-S-nitrosilación del RyRII [168, 345] sino también de la propia sGC [342, 346] podrían modular su apertura o activación, respectivamente. Por lo tanto, LNAC podría atenuar el cambio de fase inducido por luz, al impedir esta modificación post-traduccional dependiente del estado redox, afectando la comunicación río debajo de la NOS, actuando tanto a nivel del propio mensajero gaseoso producido (NO), como sobre los sustratos descriptos (RyRII y sGC).

Por otro lado, el tratamiento central con este agente antioxidante sin el estímulo lumínico modificó la fase del reloj circadiano, particularmente retrasando el reloj a CT14 (Fig. 40, grupo LNAC “solo droga”). De manera similar, se observó que la administración periférica de LNAC a ZT14 acelera la tasa de re-sincronización por retrasos al ciclo LO (Fig. 41). Si bien no se puede descartar la interacción de la LNAC con diversas cascadas bioquímicas [347], uno de los principales mecanismos por el cual esta droga afecta al estado redox se basa en su capacidad de ser hidrolizada intracelularmente a cisteína, precursora en la biosíntesis de GSH [348-352]. A pesar de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

que no fue medido en este trabajo, cabe la posibilidad de que la LNAC incremente los niveles de GSH a nivel de los NSQ, generando un cambio en el ritmo circadiano redox central (ver Figura 10 en la sección *"Introducción*"), el cual fue analizado en este trabajo, determinando la tasa GSH/GSSG en los NSQ a CT6, 14 y 18 (Fig. 39). Tal medición permite suponer que conforme avanza la fase de actividad del animal, y aumenta su tasa metabólica basal y el consumo de oxígeno [353, 354], se incrementan los niveles de las especies oxidadas sobre las reducidas. La inyección de LNAC podría estar modificando la fase de este potencial ritmo de GSH/GSSG a nivel central, alterando indirectamente la fase del reloj molecular (TTFL). En este sentido, y si bien son resultados preliminares, hemos podido observar que la administración sistémica (i.p.) de este agente antioxidante a CT14 induce la expresión de PER1 en los NSQ (Fig. 42). Además, dicha hipótesis es congruente con el resultado obtenido de la administración del propio glutatión reducido (GSH) a nivel central, dado que el tratamiento con este agente antioxidante, sin el estímulo lumínico, también generó retrasos de fase a CT14 (grupo GSH Fig. 43 a.).

Respecto a los cambios de fase inducidos por luz, se observó una clara diferencia entre los agentes antioxidantes GSH (Fig. 43) y LNAC (Fig. 40): mientras que GSH no tuvo efecto, LNAC los atenuó. Si bien ambos compuestos aumentan el nivel intracelular de cisteína, GSH debe ser primero metabolizado por la γ-glutamil transpeptidasa de astrocitos [355, 356] (Fig. 45). En contraste con la casi inmediata importación de LNAC, la incorporación enzima-dependiente para el GSH podría explicar la ineficacia de éste último antioxidante sobre la cascada inducida por luz. Por lo tanto, GSH podría estar modificando el potencial ritmo redox, (induciendo retrasos a CT14) pero no la inmediata activación de la cascada por luz.

Por otro lado, el tratamiento con S-nitrosoglutatión (GSNO), un tripéptido S-nitrosotiol, potenció tanto los adelantos como los retrasos de fase inducidos por luz (Fig. 43). Un revisión crítica sobre este compuesto [319], corrobora efectivamente que GSNO funciona tanto como un dador de óxido nítrico radical (●NO), como un agente S-nitrosilador/S-glutationilador. Por consiguiente, tanto la activación por el transmisor gaseoso sobre la sGC [357-360], como modificaciones post-traduccionales involucradas en la apertura del RyRII [361], serían factibles de ser potenciadas por

GSNO. Estos resultados apoyan la hipótesis planteada en la Discusión del capítulo 1, y formulada en el capítulo 2, sobre la capacidad de dadores de NO del tipo S-nitrosotiol (como GSNO y SNAP), para potenciar ambas vías de sincronización, ya que ambos actúan tanto liberando NO gaseoso, como promoviendo procesos de trans-S-nitrosilación.

La potenciación de los adelantos de fase inducidos por luz a CT18 por acción de la Sal de Angeli (Fig. 41), un dador de nitroxil (NO^-), permite corroborar la ya establecida acción de esta droga sobre la actividad de la sGC [362, 363]. Sin embargo, aún no está claro si esto ocurre por la acción directa del NO^- sobre la enzima [364], o si se requiere de una previa conversión de NO^- a ●NO [323]. Independientemente del mecanismo, el aumento resultante de cGMP podría ser el principal motivo de tal potenciación.

A pesar de su rápida y termodinámicamente favorable reacción sobre tioles [365-367] y su comprobada eficacia para inducir la apertura del RyRII *in vitro* [321], la administración *in vivo* i.c.v. de SA no tuvo efecto sobre los retrasos de fases inducidos por luz a CT14, a la dosis ensayada (Fig. 41). Este resultado permite suponer que si bien el NO^- posee teóricamente una mayor capacidad para generar el ataque nucleofílico sobre el átomo de azufre [368], esta reacción podría no estar favorecida en condiciones fisiológicas para este receptor intracelular asociado a retículo endosplasmático. En primer lugar, su alta reactividad por tioles lo hace altamente susceptible de ser secuestrado por GSH [366], hecho que permite pensar en que la compartimentalización intracelular es un factor crucial al momento de activar los sustratos [215, 369]. Si bien NO^- puede difundir fácilmente a través de la membrana celular [370], no se descarta que pueda actuar sobre proteínas de membrana, donde la concentración de GSH es menor [371]. Sin lugar a dudas, tales diferencias sobre la localización intracelular genera una reactividad diferencial, fenómeno que se evidencia en la preferencia del NO^- por tiolatos sobre tioles [369, 372]. Teniendo en cuenta lo anterior, y considerando el resultado de las mediciones de GSH/GSSG en muestras de NSQ (Fig. 36), se podría suponer que la elevada presencia de la versión de GSH reducido en la noche temprana (CT14), podría explicar la ineficacia de SA en promover los retrasos de fases, a la dosis ensayada.

A pesar de su similar efectividad como vasodilatadores, el óxido nítrico radical (●NO) y su versión reducida, el nitroxil (NO^-), poseen una notable diferencia en su accionar [310]. Mientras que la vía clásica dependiente de cGMP es activada en ambos casos, la infusión de NO^- induce además un aumento en los niveles plasmáticos del péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP, por sus siglas en inglés: *Calcitonin Gene Related Peptide* [373, 374]), cuya liberación es inducida por la S-nitrosilación/oxidación del canal de membrana TRPV1 (por sus siglas en inglés: *Transient Receptor Potential Channel A1* [316]). Si bien no está comprobada la relación del CGRP con los cambios de fase, es reconocida la presencia de este péptido y la de su receptor en la región ventral de los NSQ [52, 375, 376]. Tales indicios hacen suponer que el retraso de fase inducido por SA sin el estímulo lumínico ("AS-droga sola" a CT14, Fig. 33 b.) podría deberse a la liberación central de este neuropéptido. Futuros ensayos permitirán comprobar tal hipótesis.

A modo de resumen de este capitulo, se muestra en la Figura 45 un esquema que modela las intervenciones farmacológicas empleadas para estudiar la modulación de la sincronización fótica del reloj circadiano.

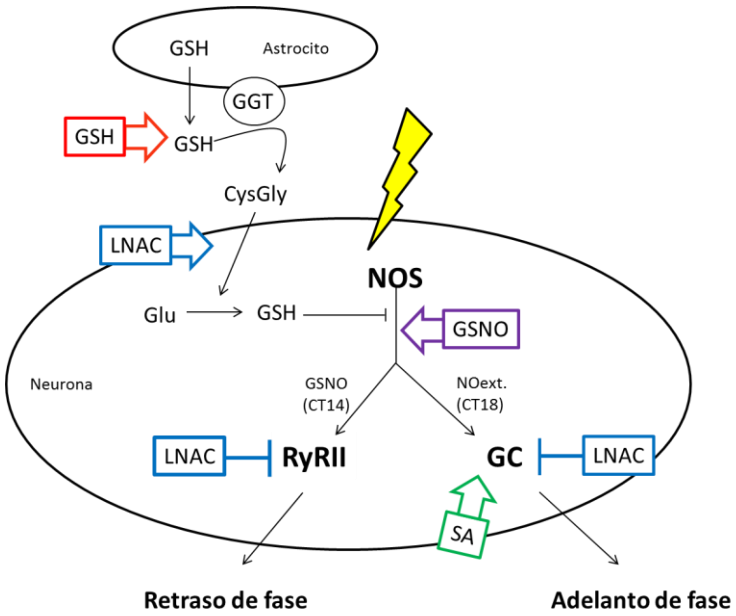


Figura 45. Modelo de acción de los antioxidantes GSH y LNAC y de los oxidantes GSNO y SA sobre la sincronización fótica del reloj central. Se muestra en la parte superior la liberación de glutatión (GSH) por parte de los astrocitos y su hidrólisis por acción de γ-glutamin transpeptidasa (GGT) a glicina-cisteína

(CysGly), cuya exportación a neuronas media la síntesis *de novo* de GSH en estas células. Este compuesto modula los niveles de NO a CT14 produciendo GSNO. La administración de GSH i.c.v. podría seguir el mismo trayecto. En cambio el tratamiento con LNAC tendría un efecto directo sobre los sustratos por su capacidad de atravesar la membrana plasmática. Tanto el dador de NO radical (GSNO) como nitroxil (SA) potenciaron los adelantos de fase inducidos por luz. En cambio, solo el dador del tipo S-nitrosotiol (GSNO) potenció los retrasos de fase.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

CAPITULO 3.

DETERMINACIÓN DE MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES REDOX-DEPENDIENTES EN PROTEÍNAS DEL RELOJ MOLECULAR.

INTRODUCCION

En los anteriores capítulos se estudió la modulación farmacológica de agentes con distinta tiofilicidad y capacidad oxidativa sobre la sincronización por la luz del ritmo de actividad locomotora en rueda del hámster. En el presente, se expondrán los resultados obtenidos *in vitro* para la acción de agentes oxidantes del tipo S-NO y ROS, sobre la dinámica de algunos componentes del reloj molecular circadiano, las proteínas PER2, BMAL1 y CRY2.

Los presentes resultados permitirán realizar una caracterización redox de tales proteínas, analizando la potencial presencia de cisteínas oxidables en su estructura, su sensibilidad a sufrir modificaciones post-traduccionales por S-nitrosilación, y su efecto sobre la estabilidad del monómero y su posible dinámica de dimerización.

Es necesario realizar una introducción extendida para este capítulo. Principalmente, para explicar cómo están conformadas las proteínas bajo estudio, siendo crucial su análisis a través de la comparación de estructuras cristalográficas obtenidas inicialmente en *Drosophila melanogaster*, con la subsiguiente comparación de su versión en ratones.

Descripción estructural del reloj molecular circadiano.

La proteína PERIOD de mamífero (mPER) y de *Drosophila* sp. (dPER), al igual que los factores de transcripción de mamíferos beta hélix-loop-hélix-PAS (bHLH-PAS) CLOCK, NPAS2 y BMAL1 y sus homólogos en *Drosophila* sp. dCLOCK (CLK) y dCYCLE (CYC) poseen dos dominios PAS organizados en tándem, referidos como PAS-A y PAS-B. El domino PAS media interacciones homo y héterodiméricas que probablemente median la funcionalidad del extremo C-terminal de la molécula, dónde se alojan motivos de control de localización celular, estabilidad, sitios de modificación post-traduccional (principalmente fosforilaciones), regiones involucradas en la regulación transcripcional (e.g. el dominio de inhibición de dCLK/CYC en dPER), sitios de unión a otros componentes del reloj (e.g. CKIε o CRY), sitios de unión para moléculas que median funciones fisiológicas (e.g. receptores nucleares) [84, 377-382]. El dominio PAS de los

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

factores de transcripción bHLH-PAS media la formación de dímeros y la especificidad del compañero [383], regulando tanto la actividad transcripcional, como el reclutamiento de los factores reguladores asociados. Estas funciones son mediadas por las regiones N-terminal, que contienen los dominios bHLH de unión a la región E-box en el ADN (región promotora de los genes reloj) [384], y por los dominios de activación transcripcional localizados en el extremo C-terminal del dominio PAS.

En los últimos años, la estructura cristalográfica de fragmentos del dominio PAS de dPER [377, 385] y los homólogos de ratón mPER1,2,3 [242, 386] han sido resueltas. Todas estas estructuras muestran la organización en tándem de los dominios PAS-A y –B de los homodímeros PERIOD y de los heterodímeros CLOCK/BMAL1, sugiriendo una posible modulación de la función de estas moléculas mediada por la dimerización por PAS [387].

En particular para mPER2 (Fig. 46), el dominio de interacción con receptores nucleares (LXXLL) juega un rol fundamental regulando su migración entre el núcleo y el citoplasma; sugiriendo un modelo de rápida importación nuclear, y una exportación y degradación lenta [388, 389]. A su vez, todas las proteínas mPER poseen una secuencia de exportación nuclear (NES) [390], que para el caso de mPER2 se encuentra dentro de la región de contacto del homodímero. De esta manera interacciones homo- y heterodiméricas de las proteínas mPER podrían modificar la función de NES afectando la velocidad del reloj circadiano [387].

Como ya se ha dicho, los cambios en el estado redox celular generan cambios circadianos en diferentes organismos: la tasa de oxidación de quinonas reducidas en cianobacterias se encuentra involucrada en el reseteo del reloj afectando la proteína reloj KaiA [391]; en *Neurospora crassa* las ROS son producidas circadianamente, regulando la actividad de la proteína reloj WC [251]. A su vez, las ROS pueden inducir la generación de puentes disulfuro por oxidación de tioles de cisteínas en sitio activos, modificando la actividad de proteínas, actuando tanto en la vía de defensa a ROS como en otros mecanismos de señalización [392]. Por lo tanto, la modificación de la concentración de ROS podría directa o indirectamente modificar el estado de oxidación de cisteínas, afectando al reloj circadiano. La modificación post-traduccional del tiol en cisteínas, es un mecanismo de señalización universal de detección redox,

participando tanto en condiciones fisiológicas o patológicas dependiendo del nivel de estímulo (Figura 47).

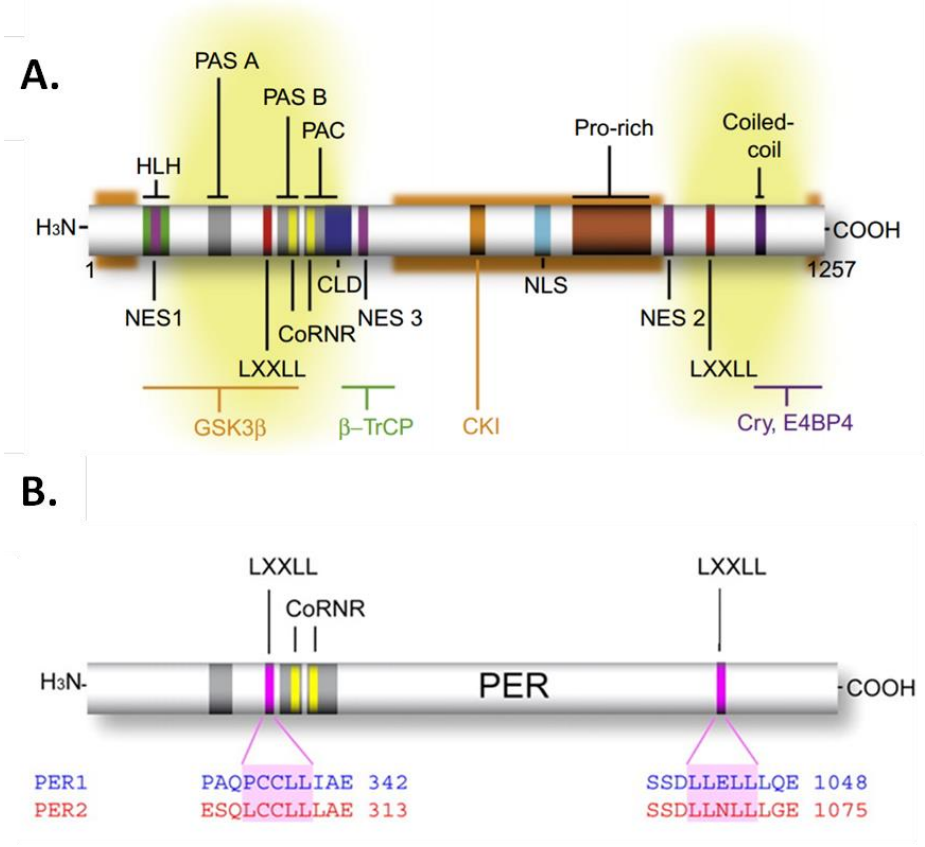


Figura 46. Regiones de interacción proteína-proteína de mPER2. A. Los dominios PAS A y B de PER, BMAL1 y CLOCK se encuentran asociados al dominio PAS-C-terminal (PAC). La región se encuentra flanqueada por los sitios de unión de quinasas regulatorias GSK3β y la ligasa ubiquitina β-Trc. Ambas actividades enzimáticas afectan la vida media de mPER2. El motivo hélice-giro-hélice (HLH) se asemeja al motivo de unión a DNA, sin embargo no es funcional. mPER2 posee tres sitios de exportación al núcleo (NES), un sitio de localización nuclear (NLS) y un dominio de localización citoplasmática (CLD). La interacción con proteínas CRY está mediada por el extremo C-terminal. A su vez, la proteína contiene secuencias de fosforilación para casein quinasa 1 (CKI). **B.** Se muestran los dominios LXXLL y CoRNR, potenciales dominios de unión a receptores nucleares. Sin embargo, solo se ha comprobado tal interacción para el dominio N-terminal LCCLL. (Figura tomada de [393])

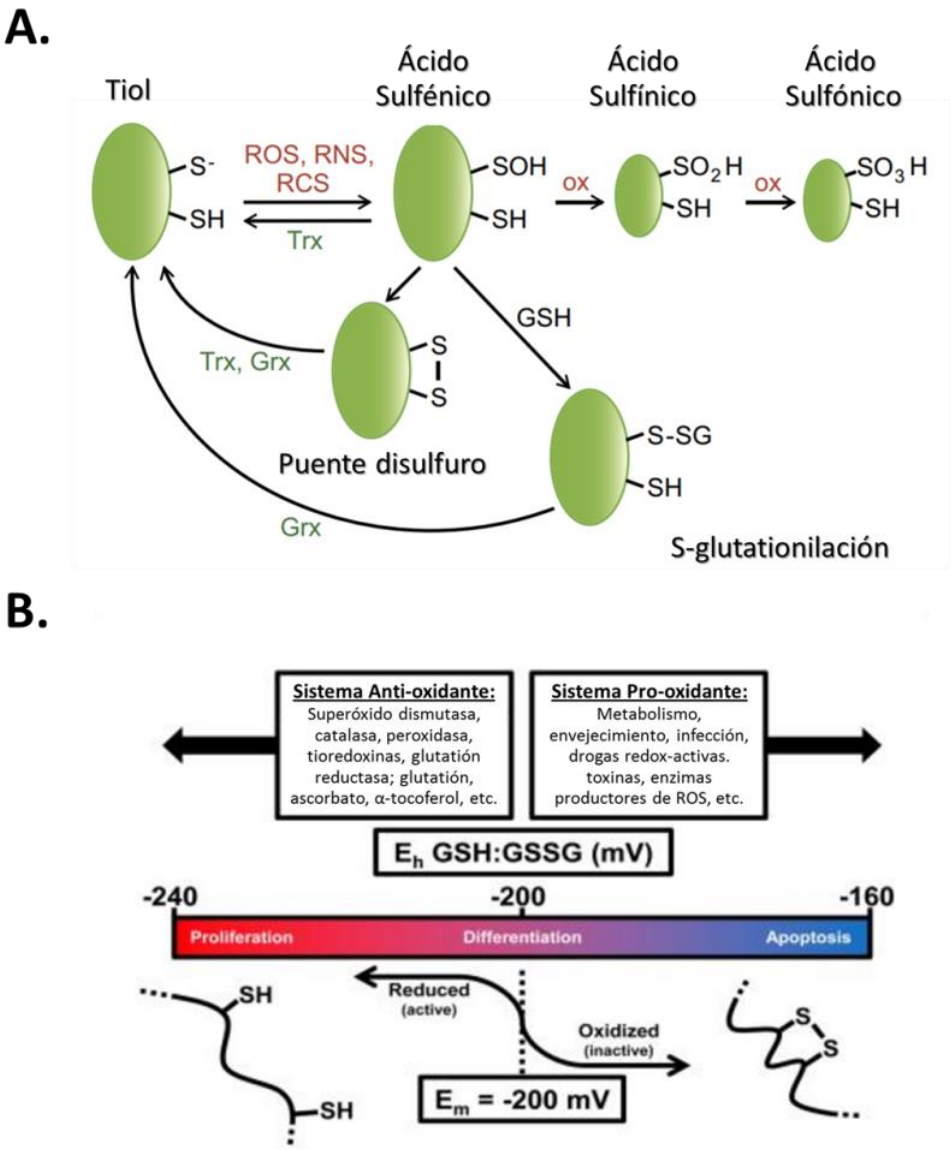


Figura 47. Modificaciones reversibles e irreversibles de cisteínas y su regulación por el estado redox. **A.** La oxidación de los tioles/tiolatos (RSH/RS^-) en cisteínas por especies reactivas de oxígeno, nitrógeno o carbonil (ROS, RNS y RCS, respectivamente) llevan a la formación del altamente reactivo ácido sulfénico (RSOH), quien puede interactuar con otro tiol para producir un puente de disulfuro (RSSR) o con glutatión (GSH) dando una S-glutationilación (RSSG). Estas modificaciones oxidantes son reversibles, y su reducción es catalizada por el sistema de tioredoxinas (Trx) y/o glutaredoxinas (Gsx). La oxidación del ácido sulfénico a sulfínico (RSO2H) y sulfónico (RSO3H) conforman las modificaciones irreversibles *in vivo* **B.** La homeostasis del estado redox es mantenida por un balance entre los sistemas opuestos anti-oxidantes y pro-oxidantes. Sin embargo, la homeostasis es un término relativo considerando el potencial del ambiente de glutatión, el principal redox buffer, que puede variar drásticamente dependiendo de la localización intracelular, pero también por procesos globales como por ejemplo el estado del ciclo celular de las células. Las proteínas con cisteínas redox-sensibles formadoras de puentes disulfuro,

responderán al potencial del ambiente cuando éste se encuentre dentro del rango fisiológico (E_m potencial intermedio, dado por la ecuación de Nernst). Para ilustrar éste punto se muestra una proteína con sus tioles/puente disulfuro controlando su actividad; el E_m de esta pareja de tioles es -200 mV cuando la célula se encuentra proliferando con un potencial de ambiente altamente reductor. Contrariamente, una célula en el camino de la apoptsis presenta un potencial oxidado (entre -200 y -160 mV), favoreciendo la formación del enlace disulfuro [Figuras adaptadas de [225, 392, 394]].

En el presente capítulo se realizará una caracterización redox *in vitro* de las proteínas PER2, CRY2 y BMAL1, haciendo uso de diferentes técnicas para evaluar la presencia de cisteínas oxidables (PEG-switch), su oxidación por S-nitrosilación (Biotin-switch), y observar el efecto de agentes oxidantes (S-nitrosocisteína y peróxido de hidrógeno) sobre la dinámica de homodimerización.

OBJETIVOS.

Objetivo general:

Determinar si componentes del reloj molecular circadiano sufren modificaciones post-traduccionales por S-nitrosilaciones de cisteínas que dependen del estado redox celular.

Objetivos particulares.

1. Demostrar la existencia de cisteínas oxidables en PER2, BMAL1, y CRY2

2. Demostrar la existencia de S-nitrosilaciones en estas proteínas.

3. Estudiar la dinámica de homodimerización por acción de agentes oxidantes.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

Drogas y reactivos.

La síntesis de S-nitrosocisteína (CysNO) fue realizada en el momento de cada ensayo experimental. Brevemente, se mezclaron cantidades equimolares (100mM) de L-cisteína (Fluka Analytical) en 0,1N HCl y (100mM) nitrito de sodio (SIGMA, 563218), se deja reaccionar en oscuridad por 10 min y se frena la reacción con 0,1N NaOH. La formación de CysNO fue determinado espectrofotométricamente a 340nM [395]. Todos los demás reactivos fueron obtenidos de Sigma Aldrich®.

Animales

Ratones machos C57BL/6J machos adultos (3-4 meses de edad) fueron criados bajo un ciclo de 12h luz: 12h de oscuridad [(12:10 LD), hora reloj de apagado de las luces 18.00], con un promedio de 200 lux a nivel del sustrato de las jaulas, con alimento y agua *ad libitum* y temperatura controlada a 20 ± 2°C. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de isoflurano y oxígeno (2%, 200 ml/min) y sacrificados por dislocación a ZT6, ZT14 y ZT22. Sus cerebros fueron inmediatamente diseccionados, colocados en tubos de 2ml, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80° C [396]. Al día siguiente, se realizó un corte coronal de los cerebros de 1mm de espesor a la altura del quiasma óptico y la rodaja fue disgregada en mortero, pesada y disuelta a 1mg tejido/ml de Buffer de Homogenización (Tris-HCl 100mM, 1%SDS, 100mM maleimida, 0.2M neocuproina, 1mM DTPA). Las muestras fueron luego resueltas en 4X Laemmli Buffer con o sin 2-mercaptoetanol al 5% para el posterior análisis por western blot respectivamente de muestras en condiciones reductoras o no reductoras.

Condiciones de cultivo *in vitro*.

Se empleó la línea celular embrionaria de riñón humano 293 (HEK293, por sus siglas en inglés "*human embryonic kidney*"). Las células fueron crecidas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con alta glucosa (Gibco, ThermoFisher®) y antibiótico-antimicótico (Gibco®) a 37° C en atmósfera humidificada con 95% aire / 5%

CO2. Para los sub-cultivos, las células confluentes en monocapa fueron repicadas cada 4-5 días divididas en una tasa 1:3-1:6, lavando con PBS pH 7.4 (sin Ca2+ ni Mg2+, Gibco®) e incubando con Tripsina/EDTA (al 0,05% Gibco®) por 10 min a 37° C. La densidad de sembrado fue de 2 x 10^6 células/ botella de 25cm^2.

Purificación de plásmidos.

Los plásmido pMC2SG5-mCry2 y pBMPC3-mBmal1 (Addgene plasmid # 31283 y 31367, respectivamente), fueron cordialmente cedidos por Aziz Sancar [397]; mientras que el pCMV Sport2 mPer2 fue cedido por Cheng Lee (Addgene plasmid # 16204 [198]). Luego de recibidos los tacos de agarosa con las bacterias *E. coli* transformadas con cada plásmido, se procedió acorde indica el proveedor (Addgene, http://www.addgene.org/). Brevemente, las bacterias se estriaron en placas LB conteniendo los antibióticos correspondientes hasta obtener colonias. Luego se picó una colonia en LB líquido con antibiótico y se incubó a 37° C con agitación continua. Parte del cultivo resultante se utilizó para realizar stock en glicerol para su almacenamiento a -80° C; y parte para obtener un nuevo cultivo para realizar la extracción del plásmido por Maxi-Prep (QIAGEN®), siguiendo las indicaciones del kit comercial. Se recuperó el DNA plasmídico en agua destilada estéril y apirógena, y se procedió a cuantificar con nanoDROP (ThermoScientific®).

Transfecciones transientes de HEK293.

Para las transfecciones transientes de las células HEK293, se empleó el reactivo Lipofectamina® 2000 (Invitrogen, ThermoFisher). Se procedió a la puesta a punto indicada por el manual del fabricante (datos no mostrados), utilizando 1,5 ul de Lipofectamina con 300ng de plásmido para pBmal1 y pCry2, o 450ng para pPer2 por pocillo en placa de 12 pocillos. Pasadas las 24hs de transfección, se procedió a un lavado con PBS y cambio de medio, manteniendo las células en incubadora gasificada a 37° C hasta el momento de los ensayos farmacológicos.

Determinación de cisteínas oxidables por el método *PEG-Switch.*

Para la determinación de cisteínas oxidables de proteínas, se procedió a realizar el método PEG-Switch [398]. Brevemente, las células HEK293 previamente transfectadas y tratadas con H_20_2 (10, 100 o 1000µM) por 10 min fueron lisadas en buffer 100mM maleimida 1% SDS en 100mM Tris-HCl pH 7.4, e incubadas por 25 min a 50° C para bloquear las cisteínas reducidas a tioles. El agregado de DTT a concentración final de 200mM y su incubación por 30 min permite la reducción de modificaciones oxidativas reversibles (puentes de disulfuro entre cisteínas). A continuación se marcaron las cisteínas ahora reducidas con Metoxi-polietilenglicol maleimida 5000 o 10000 NMR (PEG-maleimida, Sigma®) a una concentración final 10mM en 1%SDS durante 2 horas. Finalmente se interrumpió la reacción con 4X Laemmli buffer de siembra con 10% de 2-mercaptoetanol. Luego, se corrieron las muestras en un SDS-PAGE y se reveló por western blot. Debido al incremento en su peso molecular dado por el PEG, la proteína marcada correrá diferente respecto al control.

Determinación de S-nitrosilaciones por el método *Biotin-switch* dependiente de ascorbato.

Las S-nitrosilaciones fueron detectadas en las muestras a través de la reducción selectiva de los S-nitrosotioles por acción del ascorbato y su marcación posterior con biotina, método conocido como Biotin-Switch [399]. Brevemente, células HEK293 transfectadas con PER2 fueron tratadas con 100µM de CysNO o PBS durante 1, 3, 5, 10, 15 y 30 minutos. Luego de dos lavados con PBS, las células fueron lisadas en buffer de lisis (1%SDS, 100mM maleimida, 0.2mM neocupina, 1mM ácido dietilen-triamin-penta-acético, 100mM Tris-HCl pH 7.4) e incubadas por 25 minutos a 50° C en la oscuridad para bloquear los tioles libres. Las muestras fueron luego desaladas en columnas Zeba Spin (Thermo Scientific) y recolectadas en tubos conteniendo el buffer de marcación (0.5mM biotin-maleimida, 0.5% SDS, 10µM sulfato de cobre (II), 60mM ascorbato), incubándose por 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Se empleó 100mM maleimida en 100mM Tris-HCl para frenar la reacción. Basándose en el peso molecular estimado para PER2 (150kDa), se concentraron las muestra por centrifugación y filtrado a 100kDa (Amicon® Millipore). Finalmente se procedió a la

purificación de las proteínas biotiniladas con pelotitas magnéticas conjugadas con estreptoavidina (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1, Invitrogen®) y disueltas en 4X Laemmli Buffer para su posterior análisis por western blot.

Western-blot.

Las muestras resueltas por western-blot fueron todas previamente obtenidas directamente en el buffer de siembra correspondiente. Se emplearon geles pre-armados Mini-PROTEAN® TGX™ Pre-cast Gels (BioRad®) 4-20% o 4-15% de 10 o 15 calles, dependiendo del caso. Se empleó el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Western Blotting Standards* (BioRad®) y se transfirió haciendo uso del equipo Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad) a membranas Immun-Blot® PVDF (BioRad) o los pre-ensamblados Trans-Blot turbo Transfer (BioRad®), éste último solo para el caso de las muestras del Biotin-Switch. Se emplearon diluciones 1/1000 de los anticuerpos primarios conejo anti-PER2 (Milipore, AB5428P), conejo anti-CRY2 (Chemicon Int., AB15056), ratón anti-BMAL1 (Santa Cruz Biotech., sc-365645), ratón anti-ACTINA (SIGMA, A5441) o conejo anti-GAPDH (Cell Signal. AB#2118) en 0.05% Tween 20, 5% de leche descremada PBS. Los anticuerpos secundarios IgG-HRP anti-ratón y anti-conejo (Cell Signalling Tech) fueron usados en diluciones 1/5000. Se empleó el sistema de revelado Pierce™ ECL Western Blotting (ThermoFisher) o, para el caso del Biotin-switch, se empleó además el SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoFisher) para una mejor resolución. Finalmente las placas radiográficas para western blot (ThermoFisher) fueron resueltas en un revelador automático y escaneadas para su posterior análisis. Las placas radiográficas fueron escaneadas para la cuantificación de la Densidad en la Intensidad Óptica (IOD, por sus siglas en inglés “Intensity Optic Density”) aplicando el software GelProAnalyzer v3.1 (Media Cybernetics®).

Determinación cualitativa de cisteínas oxidables en PER2 y CRY2.

Se realizó el ensayo de PEG-Switch para demostrar la existencia de cisteínas oxidables en estas proteínas reloj. El análisis por western blot de extractos proteicos de células HEK transfectadas con CRY2, muestra un claro corrimiento de la banda correspondiente a CRY2, luego del tratamiento a 200 µM de H_20_2 (Fig. 48). Este ensayo permite corroborar la presencia de cisteínas oxidables en esta proteína. Sin embargo, cabe aclarar que tal efecto no fue reproducido a una concentración inferior (100 µM).

En el caso de PER2, se pudo evidenciar un ligero desplazamiento de la banda correspondiente, incluso para las dosis más bajas empleadas de H_20_2, cuando se utilizó una marcación de 10kDa (Fig. 48). Corridas en geles más largos no permitieron un bandeado claro, y tampoco se logró obtener bandas utilizando PEGs de mayor peso molecular (datos no mostrados).

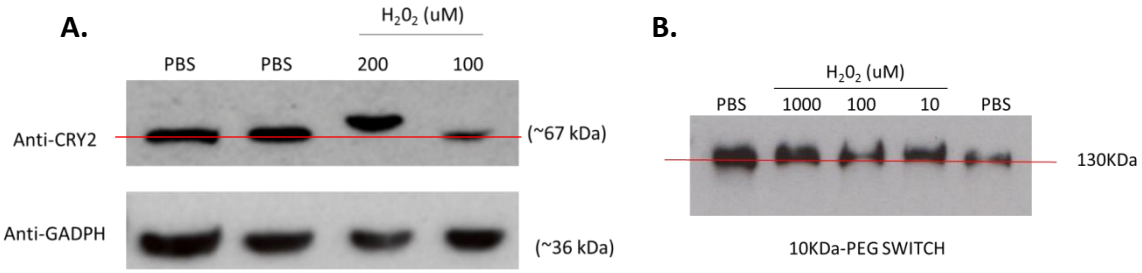


Figura 48. PEG-Switch. A. Western Blot anti-CRY2 y anti-GAPDH, y **B.** anti-PER2 de lisados de células de HEK293 transfectadas con el plásmido para mCry2 o mPer2, tratadas durante 10 min con PBS, 10, 100, 200 o 1000 µM H_2O_2 a temperatura ambiente, y procesadas por PEG-Switch. Se observa la banda correspondiente a CRY2 de alrededor de 67kDa (corre cercana a la banda de 75kDa del *ladder*), o PER2 de aproximadamente 130kDa (cercana a la banda de 150kDa del *ladder*) y el control GAPDH a 36kDa (corre cercana a la banda de 37kDa). Para el caso de CRY2 200 µM, se observa un claro corrimiento de la banda a pesos moleculares mayores, correspondiente a la marcación del PEG de 5kDa. Para el caso de PER2, todas las concentraciones ensayadas de H_2O_2 muestran un ligero desplazamiento, que podría corresponder a la marcación del PEG de 10kDa.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

Determinación de S-nitrosilaciones globales por ensayo de Biotin Switch dependiente de ascorbato.

En primer lugar se corroboró la capacidad de CysNO de inducir S-nitrosilaciones. Para ello células HEK293t sin transfectar fueron tratadas con 10, 100 o 200 µM CysNO o PBS durante 30 min. Se resolvieron las S-nitrosilaciones globales mediante western blot con Strept-HRP y se relativizó la densidad óptica integrada (IOD) de toda la calle respecto al control de carga GAPDH. El análisis de los resultados comprueba un aumento de las S-nitrosilaciones globales respecto al control para 100 y 200 µM de CysNO (Fig. 49).

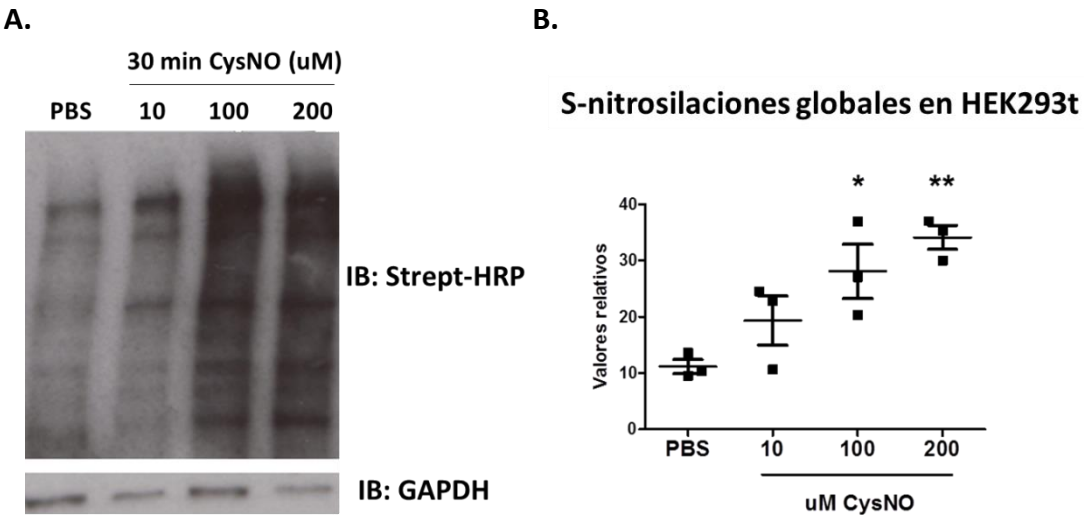


Figura 49. S-nitrosilaciones globales inducidas por CysNO. A. Se muestra la resolución de un western blot representativo con Strept-HRP sobre lisados de células HEK293 tratadas con 10, 100 o 200µM de CysNO vs. el control con PBS. **B.** SEM± media de valores de densidad óptica integral (IOD) de toda la calle relativizada a la señal IOD del control de carga GAPDH (ANOVA de una vía, $p<0.001$, T-student no paramétrico *$p<0.05$ vs. Vehículo; n=4)

Determinación de S-nitrosilaciones en PER2

Sólo se pudo detectar la versión S-nitrosilada de PER2 a tiempos cortos entre 1 y 5 min (Fig. 50).

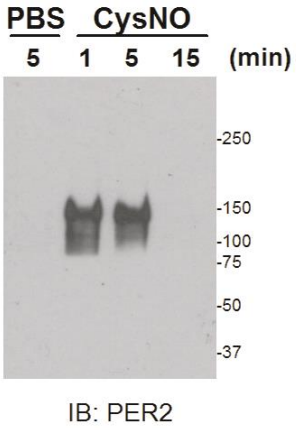


Figura 50. S-nitrosilaciones en Per2. B. Detección de PER2 S-nitrosilada resuelta por inmunoblot para PER2 marcada por Biotin-Switch y su posterior purificación por Dynabeads Streptavidin. Para generar las S-NO se trataron los cultivos con 100 μM de CysNO durante 1, 5, y 15 min y las muestras fueron inmediatamente procesadas para su marcación.

Efecto de oxidaciones por S-nitrosilación sobre la estabilidad de PER2 *in vitro*.

A continuación se procedió a analizar si la estabilidad de PER2 depende de S-nitrosilaciones, para lo cual se decidió emplear el agente S-nitrosilante CysNO, a una concentración 100µM y se observó su efecto a diferentes tiempos de incubación (1-30 minutos). El tratamiento con CysNO generó la disminución en el tiempo (1-5 min) de la banda correspondiente al monómero de PER2 (150 kDa), hasta prácticamente su no detección en el gel (10-30 min). Paralelamente se observó la aparición transitoria de una banda de 250 kDa (1-5 min), y de una banda de mayor peso molecular presente a lo largo de todo el tratamiento (1-30 min). Estas bandas fueron consideradas como: la forma "dimérica" (PER2:PER2) y multimérica de PER2 (agregado), respectivamente para el posterior análisis.

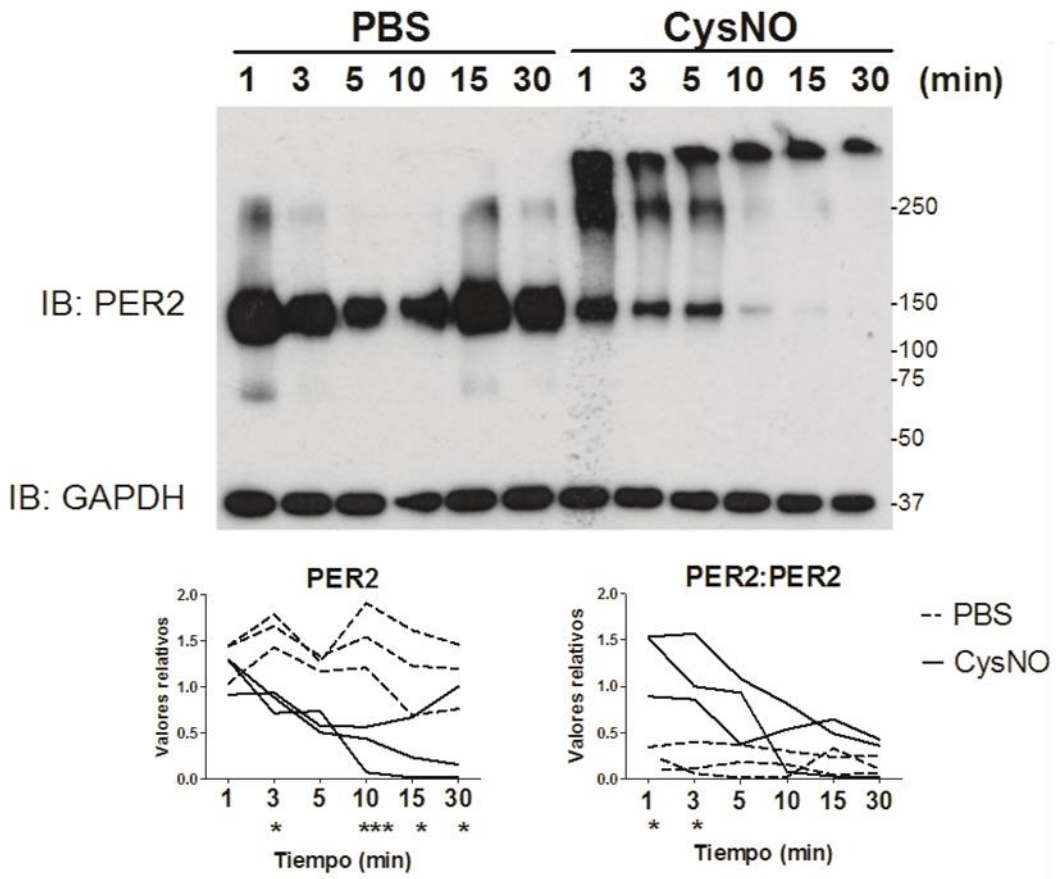


Figura 51. Efecto del tratamiento con CysNO sobre la cinética de la estabilidad de PER2. Células HEK293t transfectadas con mPer2 fueron tratadas con 100 µM de CysNO o PBS por 1, 3, 5, 10, 15 o 30 min. *Arriba:* Se muestra un inmunoblot representativo para PER2 y GAPDH; se observan las bandas correspondientes a PER2 monomérica (ligeramente inferior a 150kDa), "dimérica" (≈250 kDa,

PER2:PER2), agregados de alto peso molecular, y GAPDH (37kDa). *Abajo:* Se muestran los valores relativos para PER2 monomérica o "dimérica" (PER2:PER2) para cada réplica de 3 experimentos realizados. La cuantificación IOD para PER2 monomérica o "dimérica" fue relativizada al valor de GAPDH en cada calle (ANOVA de dos vía, para: tratamiento $p<0.0001$, tiempo $p<0.05$, seguido de Test de Bonferroni *$p<0.05$ y ***$p<0.001$; para PER2:PER2: ANOVA de dos vías, para: tratamiento $p<0.0001$, tiempo $p<0.01$, seguido de Test de Bonferroni *$p<0.05$).

Seguidamente se estudió el efecto de la concentración de CysNo sobre la estabilidad de PER2. Se observó que el tratamiento con CysNO disminuyó significativamente la cantidad relativa de PER2 monomérica, induciendo procesos de "dimerización"/agregación en el rango de 10-100 μM (Fig. 52). De la comparación de las dosis 100 y 1000 μM, se observa que la banda monomérica desaparece completamente solo a la menor dosis. Se hipotetiza que procesos irreversibles (tal como la nitración de tirosinas [400]) podrían estar siendo favorecido por la mayor dosis, a expensas de las reversibles (ver Fig. 53) S-nitrosilaciones de cisteínas.

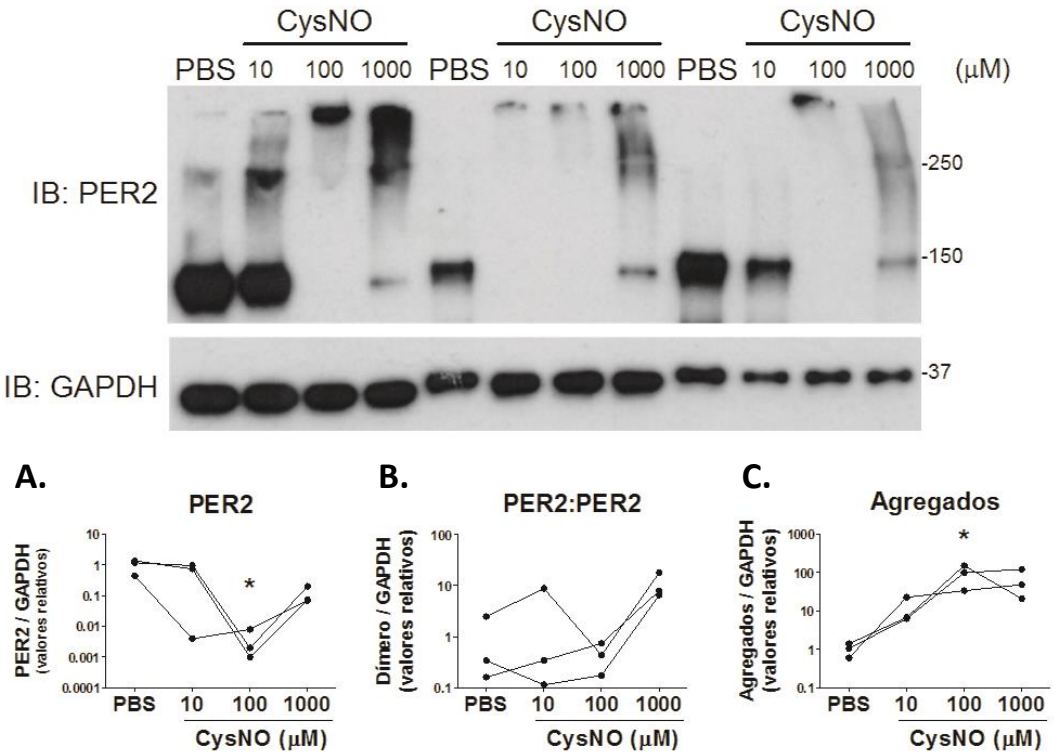


Figura 52. Efecto de la concentración de CysNO sobre la estabilidad de PER2. Células HEK293t transfectadas con mPer2 fueron incubadas con 10, 100 o 1000 μM de S-nitrocisteína (CysNO) por 30 min. Se observan las bandas correspondientes a PER2 monomérica (ligeramente inferior a 150kDa),

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

"dimérica" (≈250 kDa, PER2:PER2), agregados de altos peso molecular y GAPDH (37kDa). La cuantificación de PER2 (≈150), PER2:PER2 (≈250), o de agregados fue relativizada primero al IOD obtenido para el correspondiente control de carga (GAPDH) en cada calle, y luego al promedio del grupo control PBS para cada versión. Se muestra el valor relativo obtenido para la versión monomérica (**A.**) "dimérica" (**B.**) o agregados (**C.**), para cada réplica realizada [Para PER2 y Agregados: ANOVA de una vía, seguido de test de Dunnet: PBS vs. 100µM, *p<0.05 (n=3)].

El efecto del agente S-nitrosilador CysNO resulta reversible por acción del agente reductor 2-mercaptoetanol (Fig. 53), al observarse un aumento significativo para la banda PER2 monomérica cuando las muestras son tratadas con este agente (Fig. 53 e.).

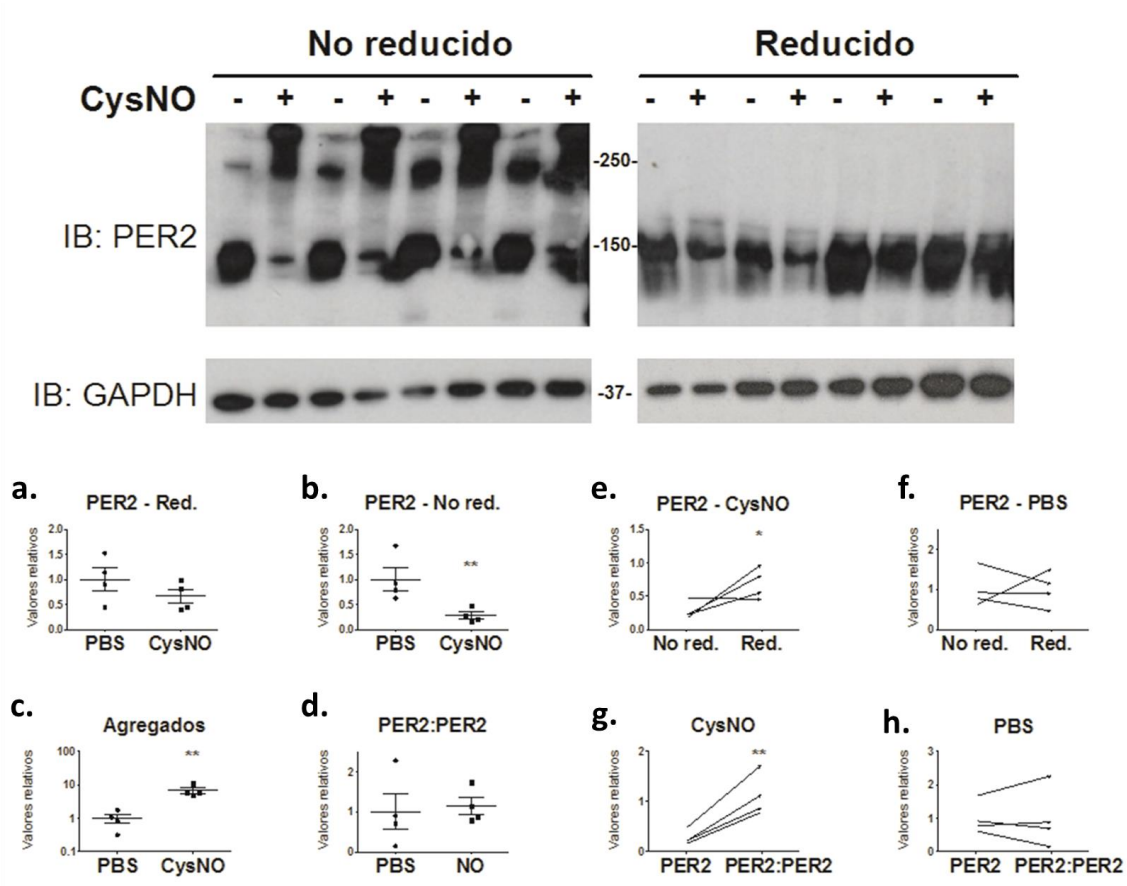


Figura 53. Reversión del efecto de CysNO sobre la estabilidad de PER2. Células HEK293t transfectadas con mPer2 fueron tratadas con 100 µM de S-nitrocisteína (CysNO) o PBS por 30 min. Se muestra el resultado del inmunoensayo (IB) para PER2 y GAPDH de muestras reducidas (derecha) o sin reducir (izquierda) con 2-mercaptoetanol. Se observan las bandas correspondientes a PER2 monomérica (≈150kDa, PER2), "dimérica" (≈250 kDa, PER2:PER2), agregados de alto peso molecular, y GAPDH (37kDa). La cuantificación de la IOD de PER2, PER2:PER2, o agregados, fue relativizada primero al IOD

obtenido para el correspondiente control de carga GAPDH de cada calle, y luego al promedio del grupo control PBS para cada versión (monomérica, dimérica, o agregados). Se muestra la media ± SEM para: **a.** monómero de PER2 de muestras reducidas; **b.** monómero de PER2 (test de Student para muestras independientes, **p<0.01), **c.** agregados (Test de student para muestras independientes, **p<0.01) y **d.** dímeros PER2 en muestras sin reducir. En **e.** y **f.** se muestra la relación antes/después para la comparación entre la muestra reducida o sin reducir de PER2 tratadas con CysNO (test de Student para muestras dependientes, *p<0.05) o PBS, respectivamente. En **g.** y **h.** se muestra el valor relativo correspondiente al monómero o dímero de cada calle (n=4) por acción de CysNO (Test de student para muestras dependientes, **p<0.01) o PBS, respectivamente.

Para verificar si el efecto de formación de dímeros/agregados se debe a la acción del grupo S-NO del compuesto, se utilizó L-cisteína (L-Cys) comparando con CysNO. El tratamiento con L-Cys no produjo cambios en la estabilidad del monómero, corroborando que el efecto observado con CysNO se debe a la acción oxidante del S-NO (Fig. 54).

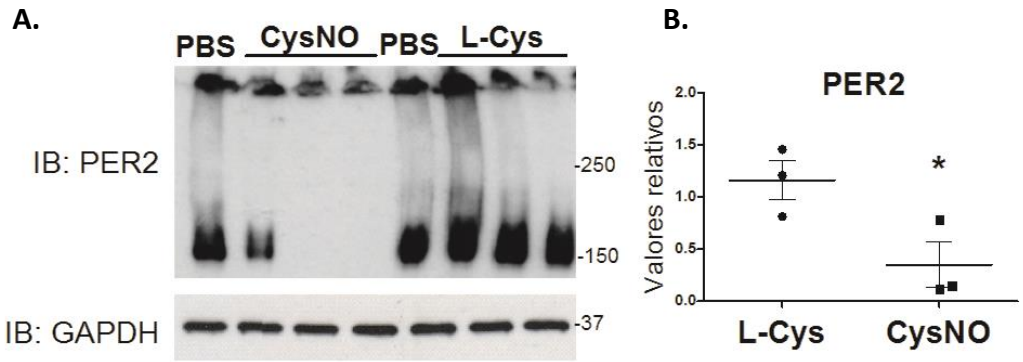
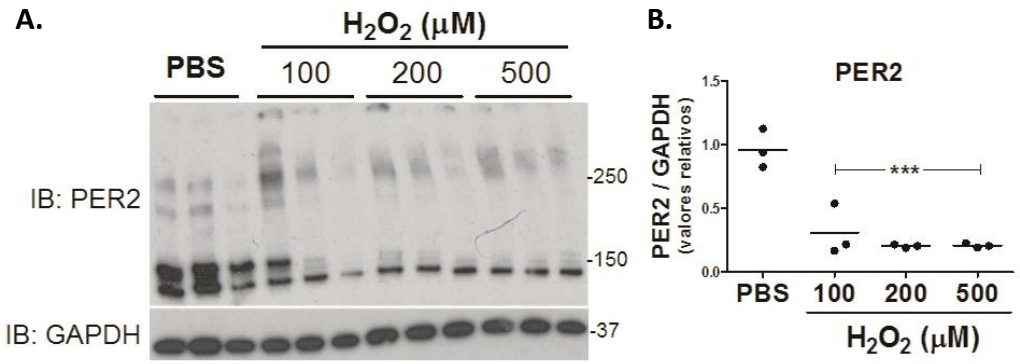


Figura 54. Comparación entre los efectos de la L-Cisteína y de la CysNO sobre la dinámica de PER2. Células HEK293t transfectadas con mPer2 fueron incubadas con 100 µM de S-nitrocisteína (CysNO) o L-Cisteína (L-Cys) por 30 min. En **A.** Se muestra el resultado del inmunoensayo (IB) para PER2 y GAPDH de muestras sin reducir. Se observan las bandas correspondientes a PER2 monomérica (ligeramente inferior a 150kDa), agregados de altos peso molecular y GAPDH (37kDa). En **B.** se muestra la cuantificación de IOD de PER2 monomérica fue relativizada al IOD obtenido para el correspondiente control de carga GAPDH de cada calle [media ± SEM para PER2 monomérica (test de Student para muestras independientes, *p<0.05)].

Además, se utilizó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como agente oxidante para corroborar que el efecto observado sea por oxidaciones. Se observó una atenuación de



la banda de 150kDa de PER2 para todas las concentraciones ensayadas (Fig. 55).

Figura 55. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la estabilidad de PER2. Células HEK293t transfectadas con mPer2 fueron incubadas con 100, 200 o 500 µM de H_2O_2 o PBS por 30 min. **A.** Se muestra el resultado del inmunoensayo para PER2 y GAPDH de muestras reducidas. Se observan las bandas correspondientes a PER2 monomérica (ligeramente inferior a 150kDa), "dimérica" (≈250 kDa), agregados de altos peso molecular, y GAPDH (37kDa), además de bandas inespecíficas. La cuantificación de IOD de PER2 monomérica fue relativizada primero al IOD obtenido para el correspondiente control de carga GAPDH en cada calle, y luego al promedio del grupo control PBS. **B.** Se muestra la media ± SEM para PER2 monomérica de muestras sin reducir (ANOVA de una vía, seguido de Test de Tukey PBS vs. 100, 200 o 500 ***p<0.001).

Efecto de oxidaciones por S-nitrosilación sobre la estabilidad de BMAL1.

Se estudió el efecto de CysNO sobre BMAL1, otra proteína del reloj molecular de la familia con dominio bHLH-PAS. Los resultados de los geles son muy variables para afirmar que BMAL1 muestre cambios en su estabilidad por acción de CysNO (Figura 56), si bien es significativo el proceso de agregación conforme aumenta la concentración de este agente (100-1000 μM).

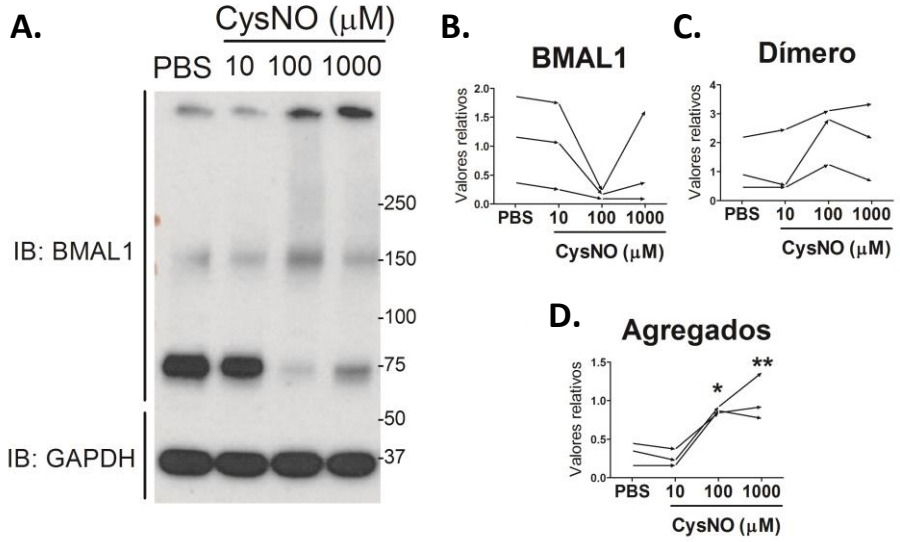


Figura 56. Efecto de CysNO sobre la estabilidad de BMAL1. Células HEK293t transfectadas con mBmal1 fueron tratadas con 10, 100, o 1000 μM CysNO, o PBS por 30 min. **A.** Se muestra el resultado de un inmunoensayo (IB) representativo para BMAL1 y GAPDH. Se observan las bandas correspondientes a GAPDH (37kDa), BMAL1 monomérica (≈75kDa), "dimérica" (≈150 kDa) y agregados de alto peso molecular. La cuantificación de IOD de BMAL1 monomérica fue relativizada primero al correspondiente control de carga GAPDH de cada calle y luego al promedio del grupo control (PBS). Se muestra los valores relativos para cada réplica realizada (n=3) para **B.** BMAL1 monomérica, **C.** "dimérica" o **D.** agregados (ANOVA de una vía $p<0.01$ para tratamiento, seguido de Test de Tukey: PBS vs. 100 $*p<0.05$; PBS vs. 1000 $**p<0.01$).

La acción del agente trans-S-nitrosilador CysNO sobre BMAL1, sería semejante al observado para diamida, un oxidante exclusivo de cisteínas formadoras de puentes disulfuros (Figura 57).

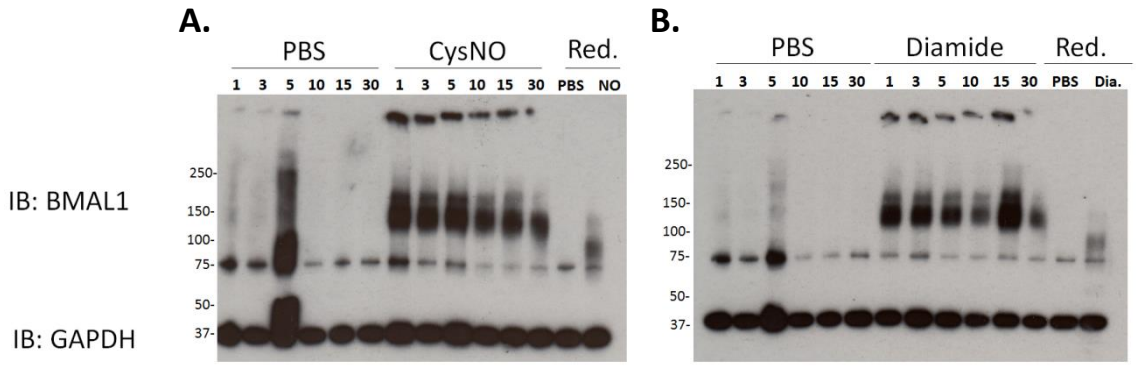


Figura 57. Efecto de S-nitrosocisteína y diamida sobre la cinética de estabilidad de BMAL1. Células HEK293t transfectadas con mBmal1 fueron tratadas con 100 µM de: **A.** S-nitrosocisteína (CysNO) o **B.** diamida durante 1, 3, 5, 10, 15 o 30 min, células control recibieron PBS. Se muestran los inmunoensayos (IB) para BMAL1 y GAPDH de muestras sin reducir, exceptuando las calles indicadas (Red.) que corresponden a los grupos 30 min tratados con 2-mercaptoetanol. El número de réplicas disponible no permite realizar el análisis estadístico (n=2).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

Efecto de oxidaciones por S-nitrosilación sobre la estabilidad de CRY2.

La Figura 58 muestra un resultado preliminar analizando la acción de CysNO sobre la estabilidad de CRY2, otro factor de transcripción de la maquinaria del reloj circadiano que carece de dominios PAS. La formación de posibles "dímeros" ocurriría solo cuando las células se exponen al agente oxidante durante largos períodos (Figura 58).

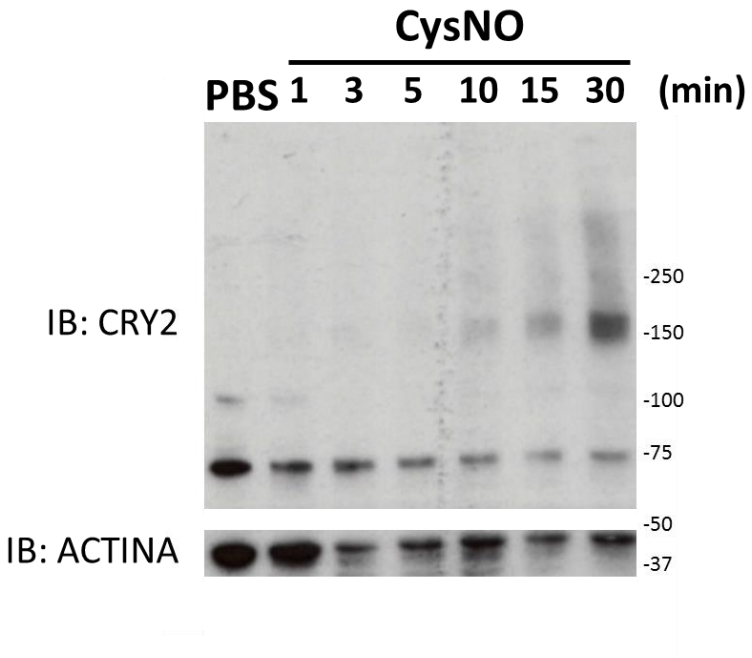


Figura 58. Efecto de S-nitrosocisteína sobre la cinética de estabilidad de CRY2. Células HEK293t transfectadas con mCry1 fueron tratadas con 100 µM de S-nitrosocisteína (CysNO) durante 1, 3, 5, 10, 15 o 30 min, células control recibieron PBS durante 30 min. Se muestra el inmunoensayos (IB) para CRY2 y ACTINA de muestras sin reducir. Se observa el monómero (≈75kDa) y dímero (≈150kDa) de CRY2. El número de réplicas no permite realizar el análisis estadístico (n=2).

Efecto del tratamiento *in vitro* de agentes oxidantes sobre la estabilidad de PER2 de cerebro de ratón.

En la Figura 59, se muestra un ensayo preliminar sobre la respuesta de muestras de cerebro de ratones C57BL/6J tomadas a ZT6, que recibieron 0.25 o 1mM de peróxido de hidrógeno (n=2) o S-nitrosocisteína (n=1) en el buffer de homogenización durante 5 min. Luego, las muestras fueron resueltas en el buffer de corrida con o sin 2-mercaptoetanol, para su posterior inmunodetección para PER2 o GAPDH por western blot. Bajo condiciones reductoras, se observa claramente en todas las calles la banda correspondiente a PER2 (150kDa), mientras que no se observa la banda correspondiente a PER2 "dimérica" (250kDa). Bajo condiciones no reductoras, la banda para PER2 resulta menos intensa en las calles correspondientes a las muestras tratadas con H_2O_2 (y CysNO), al comparar con PBS.

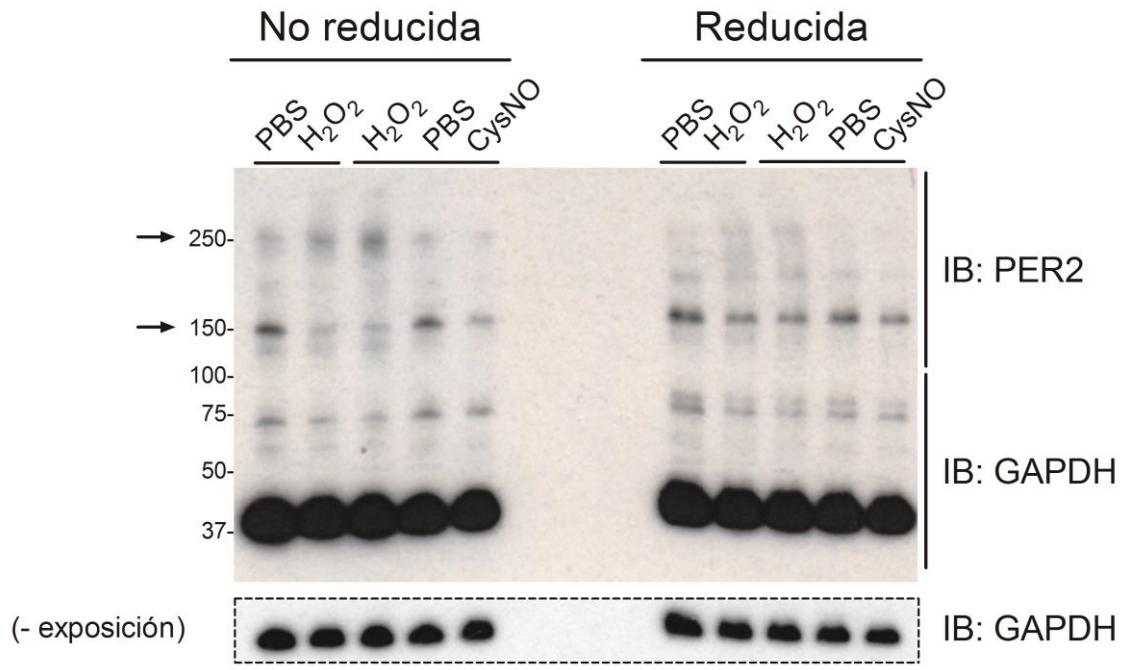


Figura 59. Efecto *in vitro* de S-nitrosocisteína y peróxido de hidrogeno sobre muestras de cerebro de ratón tomadas a ZT6. Ratones C57BL/6J machos fueron sacrificados a ZT6, un corte coronal del cerebro a la altura del quiasma óptico fue homogenizado, obteniendo una muestra de 1mg de tejido/ml de buffer. Se trató a la muestra con 100 µM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o S-nitrosocisteína (CysNO), mientras que los controles recibieron PBS por 5min. Se muestra el inmunoensayo para PER2 y GAPDH. Se observa la banda de PER2 (150kDa) al igual que su versión "dimérica" (250kDa).

Estudio del ritmo diario en la estabilidad de BMAL1 en muestras de tejido de ratón.

Se determinó por inmunoensayo la presencia de "dímeros" de BMAL1 (~150kDa) en muestras de cerebro de ratones C57BL/6J tomadas en la mitad del día (ZT6), en la noche temprana (ZT14), y tardía [ZT22 (Figura 60)]. Si bien se observa un incremento de BMAL1 monomérica (~75kDa) en ZT22, tal diferencia no resulta significativa. Lo mismo ocurre con la mayor proporción de BMAL1 "dimérica" respecto a la monomérica observada para ZT6, la cual no es significativa.

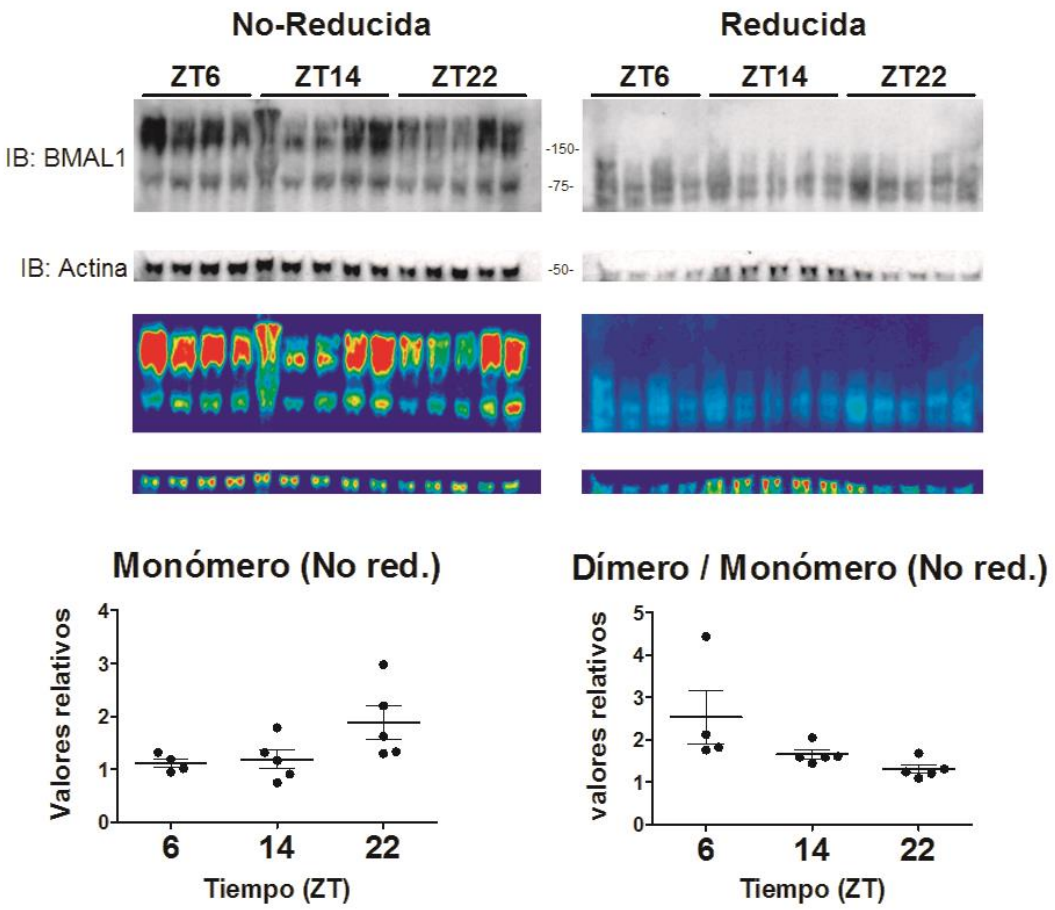


Figura 60. Relación BMAL1 dimérica/monomérica en muestras de cerebros de ratones a lo largo del día. Ratones C57BL/6J mantenidos bajo ciclos 12:12 LO fueron sacrificados a ZT6, ZT14 y ZT22. Cada calle corresponde a la muestra del corte coronal a la altura del quiasma óptico conteniendo los núcleos supraquiasmáticos de cada cerebro. Se muestran los inmunoblots para BMAL1 y Actina de las muestras previamente tratadas ("Reducida", derecha) o sin tratar con 2-mercaptoetanol ("No reducida", izquierda). Las figuras transformadas a color permiten establecer la cuantificación planteada en la parte inferior, para la cual se tomó la banda doble observada para BMAL1 monomérica de ~75kDa [bandas

acorde al *data sheet* del anticuerpo empleado, observadas también por otros grupos con con otros anticuerpos [401]] y la banda doble correspondiente a la "dimérica" (~150),. (n=4 para ZT6, n=5 para ZT14 y ZT22).

Muestras de hígado de ratones C57BL/6J tomadas durante el día (ZT6), en la noche temprana (ZT14) o tardía (ZT22) presentan "dímeros" de BMAL1 (~150kDa), los cuales son reducibles por el tratamiento con 2-mercaptoetanol (Figura 61). La cuantificación relativa del dímero respecto al monómero, en condiciones no reducidas, muestra una disminución conforme avanza el día.

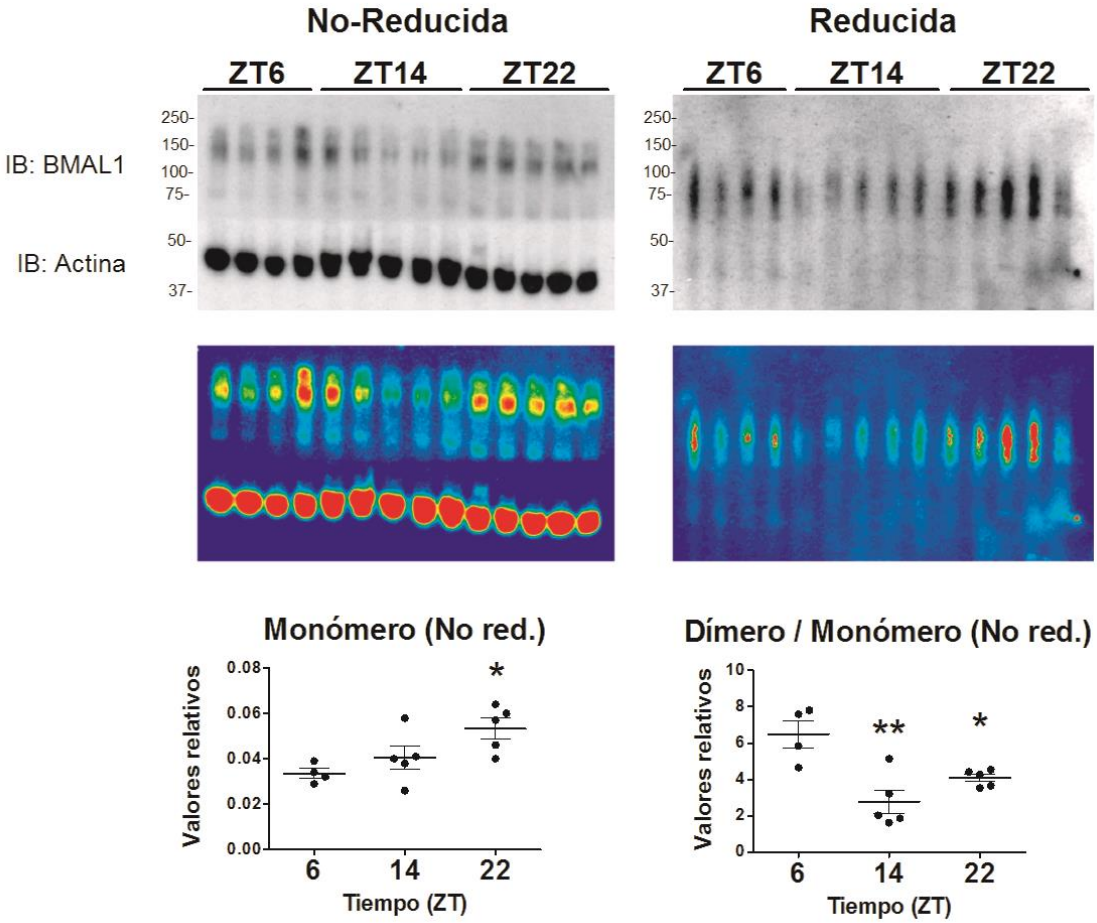


Figura 61. Relación BMAL1 dimérica/monomérica en extractos hepáticos a lo largo del día. Ratones C57BL/6J mantenidos bajo ciclos 12:12 LO fueron sacrificados a ZT6, ZT14, y ZT22. Cada calle corresponde a una muestra de tejido hepático de un animal. Se muestran los inmunoblots para BMAL1 y Actina de las muestras previamente tratadas ("Reducida", derecha) o sin tratar con 2-mercaptoetanol ("No reducida", izquierda). Las figuras transformadas a color permiten establecer la cuantificación

planteada en la parte inferior, para la cual se tomó la banda doble observada para la versión monomérica (~75kDa) y dimérica (~150kDa) de BMAL1 (bandas acorde al *data sheet* del anticuerpo empleado, previamente observadas por otros grupos incluso con otros anticuerpos [401]).

DISCUSIÓN

En este capítulo se estudió el efecto de la modulación del estado redox celular sobre la estabilidad de proteínas del reloj *in vitro*. En primer lugar, se halló que PER2 (y posiblemente CRY2) posee cisteínas oxidables, y se logró purificar a PER2 S-nitrosilada por acción del S-nitrosotiol CysNO. Este tipo de oxidación disminuyó la estabilidad del monómero tanto del componente positivo del reloj circadiano molecular, PER2, como del negativo BMAL1, induciendo posibles procesos de homo- y multi-merización. Con todos estos resultados, puede inferirse que, para PER2, esta modificación sobre cisteínas termina finalmente oxidándolas en puentes disulfuro. Este rol intermediario para la S-nitrosilación ha sido recientemente propuesto por otros investigadores [402]. Por lo tanto, la ya descripta S-nitrosilación *in vitro* de BMAL1 [403], podría estar mediando los procesos dimerizantes observados en el presente trabajo.

Si bien el proceso de dimerización *in vitro* para PER2 y PER3 no se encuentra modulado por un shock de suero [404], aquí se comprueba que señales más fuertes e inmediatas como ROS (H_2O_2) y RNS (CysNO), inducen la homodimerización de PER2, permitiendo suponer una modulación sobre el reloj circadiano molecular por parte de estas moléculas señalizadoras, como por ejemplo, durante la activación de nNOS en la sincronización fótica. En contraste, CRY2 solo sufrió este estilo de modificación postraduccional, redox-dependiente, para el mayor tiempo de exposición al agente oxidante. Esto también se observó con el protocolo PEG-Switch, dónde solo a la dosis más alta se presenta tal modificación oxidativa (Fig. 48 A.) Si bien existen ejemplos en la naturaleza donde la familia de las proteínas criptocromo homodimerizan para funcionar como fotoreceptores [405], no sería éste el caso en mamíferos dado que CRY no cumple este rol [406]. Por lo tanto, la homodimerización observada *in vitro* solo para las condiciones más extremas (30 min de exposición o 200 µM), podría relacionarse a un mecanismo que ocurre, por ejemplo, durante el estrés oxidativo, más que como un mecanismo de señalización fisiológica en mamíferos. En cambio, la casi inmediata (1 min de exposición al agente oxidante) homodimerización observada en PER2 y BMAL1, podría estar relacionada a la presencia de los dominios dimerizantes PAS y bHLH-PAS, respectivamente (Ver ANEXO). Asimismo, la observación preliminar de que la proteína PER2 endógena de muestras de cerebro de ratones sufre

homodimerización por acción de H_2O_2 *in vitro*, permitiría descartar el posible efecto sobre la estabilidad de la proteína debido a su sobreexpresión en las células HEK.

Por otro lado, se evaluó el ritmo diario en la estabilidad de BMAL1 en muestras de hígado y cerebro de ratones C57BL/6J tomadas en el medio del día (ZT6), en la noche temprana (ZT14) o tardía (ZT22). El análisis de los inmunoblots permite confirmar la presencia de dímeros de BMAL1 para ambos tejidos. En particular para las muestras de hígado, se observó una variación diaria en la relación dímero/monómero (Fig. 61), con un máximo diurno en ZT6, y que se corresponde con un incremento del monómero desde ZT6-ZT22. Se podría hipotetizar entonces que el dímero de BMAL1 se encontraría asociado con la fase de degradación del ritmo circadiano de BMAL1. En este sentido, se ha propuesto que el dímero de BMAL1 competiría con CLOCK para la formación del complejo activador CLOCK:BMAL1 (Figura 62 [407]) o con NPAS2 [93, 245]. De esta manera la dimerización de BMAL1 observada en el presente capítulo por acción de ROS y RNS permite suponer que tales moléculas señalizadoras podrían afectar directamente la actividad del reloj circadiano, afectando el balance con CLOCK, o NPAS2.

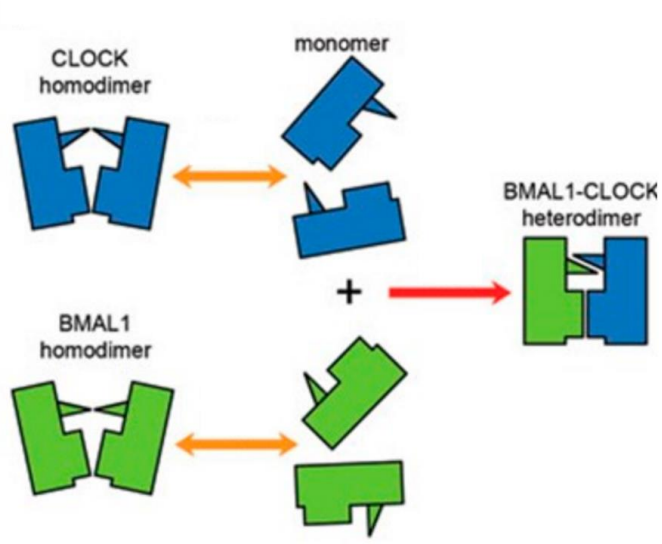


Figura 62. Mecanismo de reconocimiento del complejo CLOCK:BMAL1. En el modelo propuesto el reconocimiento mutuo permite la interacción entre CLOCK y BMAL1. El complejo heterodimérico, posiciona a dos residuos con reconocida importancia para el proceso de heterodimerización (His 84 en CLOCK y Leu 125 en BMAL1, ambos próximos a su región bHLH) bien apilados. Figura modificada de [407].

Si bien la homodimerización de PER2 y BMAL1 promovida por ROS y RNS podría estar mediada por la bien documentada interacción por dominios PAS en esta proteína, no existen evidencias de que esta interacción pueda ser modulada por agentes oxidantes, ni tampoco de que la dimerización entre dominios PAS podría establecerse por puentes disulfuros. Sin embargo, dímeros de la región PAS de PER1/2/3 han sido resueltos en cristalografía de rayos X. Es crucial entender también que muchas cisteínas pueden sufrir procesos de oxidación frente a agentes oxidantes, más aún *in vitro*; pero solo un par de ellas solamente podrían ser cisteínas modulables. En este sentido PER2 posee un total de 32 cisteínas en su estructura, 9 conservadas (presentes también en PER1 y PER3), de las cuales 4 se encuentran en la región PAS. En el ANEXO siguiente se realizará un análisis *in sílico* de las secuencias aminoacídicas para llegar a las posibles cisteínas candidatas, permitiendo realizar una discusión más extendida del capítulo.

Independientemente de cuál o cuáles cisteínas resulten S-nitrosiladas, se comprueba aquí por primera vez la detección de esta novedosa modificación post-traduccional en el reloj circadiano molecular, en particular sobre su componente positivo PER2. Incluso, se podría hipotetizar que esta modificación por S-nitrosilación podría estar ocurriendo durante la activación de nNOS en la sincronización fótica.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

ANEXO.

En el capítulo 3, se estableció que la oxidación de cisteínas modula la homodimerización de PER2 y BMAL1. En el presente ANEXO, se analizará la estructura aminoacídica de estas proteínas con el fin de arribar a las cisteínas candidatas a mediar tal proceso de homodimerización, o inferir cómo podría afectar la interacción con los otros sustratos proteicos. Vale la aclaración de que el motivo PAS de PER2 de ratón ha sido cristalizado como un multímero de dos homodímeros (cuatro moléculas), y que para el caso de PER de *Drosophila* sp. se han obtenidos cristales tanto para el motivo PAS monomérico, como para el homodímero y un multímero de cuatro homodímeros (ocho moléculas). Para el caso de BMAL1, solo se encuentran los cristales heterodiméricos con CLOCK, abarcando además de la región PAS, el dominio básico hélice giro hélice (bHLH).

PER2

En primer lugar es necesario analizar cuántas cisteínas tiene cada una de las proteínas. En este sentido, PER2 de ratón posee 32 cisteínas en total; sin embargo, del alineamiento con las otras PER de ratón (mPER1 y mPER3), rata (rPER1/2/3) y humano (hPER1/2/3) se encuentran solo 9 cisteínas conservadas. Dos de ellas resultan las involucradas en la coordinación del átomo de Zinc en el heterodímero con mCRY (Cys1221 y Cys1224 en mPER2), 4 cisteínas se encuentran conservadas en el dominio PAS, y las restante en zonas conservadas en la región intermedia entre el dominio de unión a CRY (C-terminal) y la de dimerización por PAS (N-terminal) de unión a quinasas.

Debido a que previamente se corroboró que la homodimerización de PER está mediada por el dominio PAS, nos focalizaremos en las 4 cisteínas conservadas en mamíferos obtenidas del alineamiento para esta región. Pero antes se debe realizar una aclaración respecto al propio dominio PAS, ya que si bien se valora la significancia en la conservación de secuencia [408] los límites estructurales obtenidos por estructura cristalográfica demuestran que el dominio para el caso de PER2 sería más grande que el dado sola por la secuencia (ver Tabla 4 [409]).

	Dominios			
	Estructurales		Secuenciales	
CLOCK	PAS-A	106–258	PAS 1	107–177
	PAS-B	274–376	PAS 2	262–332
BMAL1	PAS-A	142–320	PAS 1	143–215
	PAS-B	353–442	PAS 2	327–397
PER2	PAS-A	191–315	PAS 1	179–246
	PAS-B	329–435	PAS 2	319–385

TABLA 4. Fronteras del dominio PAS para componentes del reloj molecular. El dominio estructural resulta más grande que el dado por la secuencia aminoacídica [(dominio secuencial[409]].

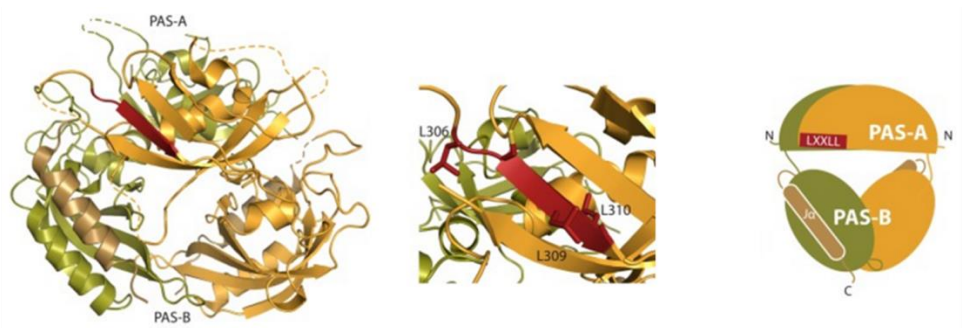
En particular, dos cisteína consecutivas conservadas en el dominio PAS en las proteínas PER llaman la atención. Las Cys307 y Cys308 en mPER2 se encuentran posicionadas en la región C-terminal del subdominio PAS-A (Fig. A) y forman parte de uno de los dos motivo LXXLL de unión a receptores nucleares que posee mPER2 [Fig. 46 [382]]. El motivo LCCLL media la interacción de los receptores PPARα y REV-ERBα con PER2 en ratones [382], y de RORα con PER2 de Zebrafish (zPER2, Fig. A. V. [410]). Sin embargo, no existe conservación de este motivo LXXLL entre las diferentes versiones de PER de mamíferos, las leucinas se van perdiendo desde el motivo completo LCCLL en PER2, para pasar un PCCLL en PER1 o un PCCLT en PER3 (Fig. A. I.). Tal pérdida de leucinas estaría entonces correlacionado con una variabilidad en las interacciones proteína-proteína, explicándose de esta forma la observación que mPER2, pero no mPER1, se une con REV-ERBα a través del motivo LCCLL [382]. Causalmente, de todas las versiones de PER de mamífero, PER2 es la que más se parece a la versión de *Drosophila* sp. (dPER) [198, 411]. Esta semejanza se puso recientemente en evidencia con la corroboración de la modulación del reloj circadiano en moscas vía la interacción de dPER con el receptor nuclear E75 (homólogo de REV-ERB [412, 413]). Si bien la interacción con E75 quedó establecida, los autores no demuestran con qué región de dPER ocurriría. En este sentido, el análisis de la secuencia de dPER tampoco arroja ningún motivo consenso LXXLL; sin embargo, y en semejanza con las PER de mamíferos, dPER presenta un par cisteínas consecutivas conservadas en el dominio

PAS-A (Cys242 y Cys241). En otras palabras, el par de cisteínas se encuentra conservado no solo entre PER1/2/3 en mamíferos, sino que también ocurre lo mismo con una PER evolutivamente más antigua, posicionando la conservación de dicha secuencia como un factor clave para el funcionamiento de tales proteínas. Sin embargo, una diferencia crucial se presenta cuando se compara la posición relativa del motivo consecutivo de cisteínas (CC): en dPER se encuentra en la región más N-terminal del subdominio PAS-A; mientras que en mamíferos el motivo CC pasa a ocupar una posición más C-terminal dentro del mismo subdominio. Estudios fiologenéticos sobre la secuencia nucleotídica de los genes *period* explican su evolución por duplicación génica y selección positiva darwiniana, estableciendo el siguiente orden desde un ancestro común: per3, per1 y per2 (Fig. A. III. [414, 415]). Por lo tanto, se hipotetiza que el motivo CC podría haber estado originalmente en la posición más N-terminal y luego por eventos de duplicación/mutación podría haber "saltado" a una posición más C-terminal dentro del mismo subdominio, ganando leucinas próximas al CC cuya selección positiva por ganancia de función (e.g. unión a receptores nucleares) tuvo como resultado la obtención del dominio completo LCCLL en mPER2.

La posición del motivo $C_{241}C_{242}$ en dPER se encuentra seguida de la Val243, un aminoácido que demostró ser clave para el período del reloj en moscas: la mutación Val243Asp generaba moscas con un período endógeno sensible a temperatura de 28 h (mutante conocido como PER*Long* o PER^{L} [416]). Tal mutante permitió establecer la identidad de PER en Drosophila y, debido a su posición en el subdominio PAS-A, se suponía que tal mutación podría estar afectando la estabilidad/interacción de esta región; lo cual fue posteriormente confirmado por la reducida capacidad de homodimerización *in vitro* [417]. Es de esperarse entonces que una mutación de un aminoácido no-polar (valina) por uno polar-ácido (aspartato) generaría profundas diferencias en la microrregión circundante e indirectamente sobre toda la proteína. En este sentido, y a la luz de lo expuesto hasta el momento, se puede hipotetizar que la mutación Val243Asp podría estar afectando la reactividad de las cisteínas en el motivo CC. Es decir, hipotetizamos que el fenotipo PER^{L} podría deberse al cambio del microambiente de cisteínas potencialmente redox-sensibles. Nos permitimos

hipotetizar entonces que un fenotipo similar al de PER^L se podría obtener si dPER fuese mutada en Cys242 y/o Cys241. Esta hipótesis se sostiene además en el hecho que la Val243 no se encuentra conservada entre especies, en contraste con lo que ocurre con el motivo CC. Además, si se observa en detalle la secuencia de mamíferos solo la más antigua de ellas (PER3) posee una valina próxima al motivo CC, la cual se va "perdiendo" a expensas de ganancia en leucinas en PER1 y PER2 (Fig. A. II). De aceptarse la posibilidad de que el motivo CC "saltara" de una región a otra dentro del subdominio PAS-A durante el proceso de duplicación génica, podría suponerse que la presencia de ésta valina en PER3 es un vestigio de su posicionamiento en la región más N-terminal.

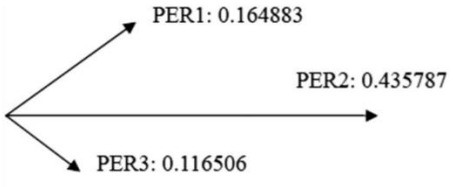
I.



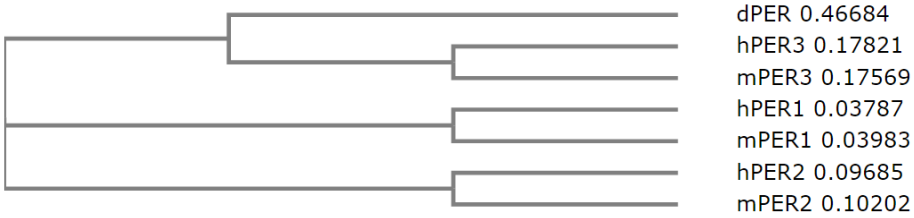
II.

```
hPER3     FCRIRGGEDRKQEKCHSPFRIIPYLIHVHHPAQPELESEPCCLTVVEKIHSGYEAPRIPV
mPER3     FCRICGGGDRE-KRHYSPFRILPYLVHVHSSAQPE--PEPCCLTLVEKIHSGYEAPRIPV
rPER3     FCRICGGGDREQKRHYSPFRILPYLVHVHSPAQPE--PEPCCLTLVEKIHSGYEAPRIPV
hPER1     FCRIRGGPDRDPGPRYQPFRLTPYVTKIRVSDGA--PAQPCCLLIAERIHSGYEAPRIPP
mPER1     FCRIRGGPDRDPGPRYQPFRLTPYVTKIRVSDGA--PAQPCCLLIAERIHSGYEAPRIPP
rPER1     FCRIRGGPDRDPGPRYQPFRLTPYVTKIRVSDGA--PAQPCCLLIAERIHSGYEAPRIPP
hPER2     FCRVSVRKSHENEIRYHPFRMTPYLVKVRDQQGA--ESQLCCLLLAERVHSGYEAPRIPP
mPER2     FCRVSVGKHHENEIRYQPFRMTPYLVKVQEQQGA--ESQLCCLLLAERVHSGYEAPRIPP
rPER2     FCRVSVGKHHENEIRYQPFRMTPYLVKVQEQKGA--ASQLCCLLLAERVHSGYEAPRIPP
          ***:     :.    : ***: **: :::         : *** :.*::**********
```

III.



IV.



V.

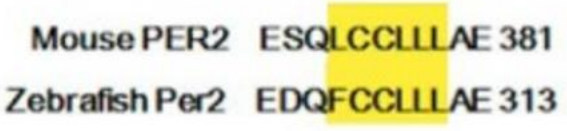


Figura A. Estructura del homodímero de mPER2, donde los monómeros se colorean en naranja y verde; y en rojo se resalta el motivo de unión a receptores nucleares LCCLL. La homodimerización ocurre por el subdominio PAS-B [Figura tomada de [409]. **B.** Se muestra el alineamiento para PER1/2/3 para humano (h), ratón (m) y rata (r), resaltándose en amarillo el motivo LXXLL. **C.** Árbol para PER1/2/3 basándose en su distancia funcional[414]. **D.** Dendograma obtenido por Clustal Omega para las secuencias proteicas de PER de drosophila o PER2 de humano (h) o ratón (m). E. Secuencia del motivo LXXLL para PER2 de zebrafish o ratón[410]

En contraste con la mutación PER^{L} en Drosophila, la mutación Ile324Asn en la región *interlinker* de los subdominios PAS-A y PAS-B de mPER2 resulta en un fenotipo de período corto referido como ratón PER2*EarlyDoors* [$PER2^{Edo}$ [418]]. Nuevamente el cambio de un aminoácido no polar a otro polar, conlleva a una diferencia en la estabilidad del homodímero que se relaciona con una mayor sensibilidad a la degradación por CKIε de PER^{Edo} [418]. De esta manera, queda claro que cualquier afección en la estabilidad del dominio PAS genera profundos trastornos al funcionamiento del reloj.

Un hecho fundamental para considerar potenciales cisteínas redox-sensibles es su posición en la estructura de la proteína, en particular si la candidata se encuentra disponible en la superficie para ser accesible a las moléculas señalizadoras de ROS/RNS. El análisis de la estructura cristalográfica de mPER2 arroja que el motivo LCCLL posee los tioles de ambas cisteínas disponibles al solvente (Fig. B) y alejados de la superficie de contacto del homodímero cristalizado, lo que permite descartar la generación de puentes intermoleculares a través de ellas. Por el contrario, su localización podría estar relacionada con su función ya descripta como sitio de unión a receptores nucleares.

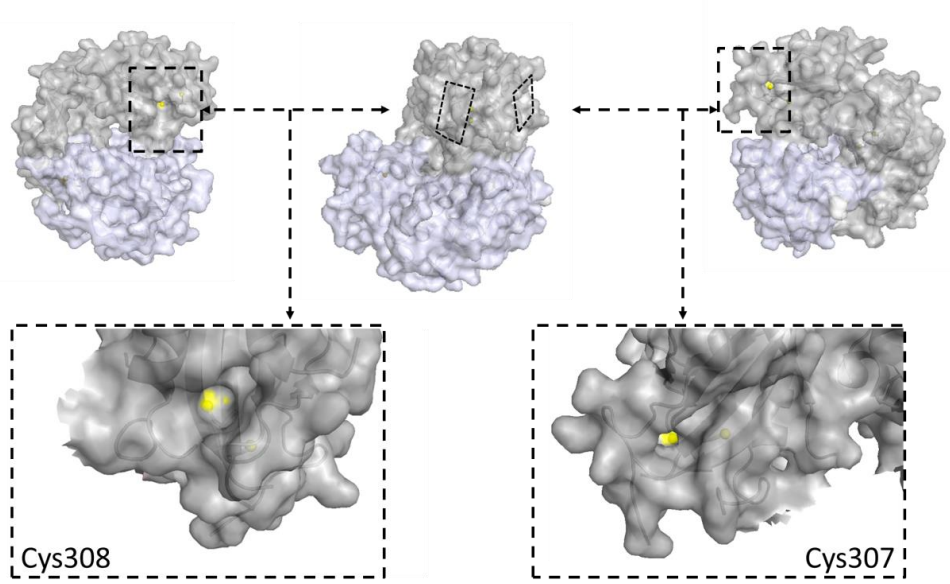


Figura B. Estructura cristalográfica del dímero de la región PAS de mPER2. *Arriba:* se muestra el dímero PAS correspondientes en tres posiciones diferentes (giros de ~90° sobre un eje imaginario vertical). Los diferentes colores corresponden a cada monómero. *Abajo:* se muestra la superficie transparentada y en esferas amarillas los tioles correspondientes a las cisteínas 307 y 308 del motivo LCCLL de unión a receptores nucleares. El color amarillo en superficie corrobora la disponibilidad de estos tioles al solvente.

Por otro lado, si bien ambos tioles del motivo LCCLL en PER2 podrían *a priori* sufrir procesos de oxidación, la distancia entre estos tioles de 8.6 Å (Fig. C) dificultaría la generación de un puente disulfuro intramolecular (se toma como criterio una distancia de ~5 Å, correspondiente a dos veces la distancia promedio de un puente disulfuro [419-421]).

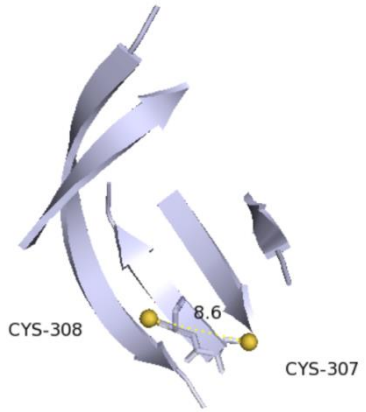


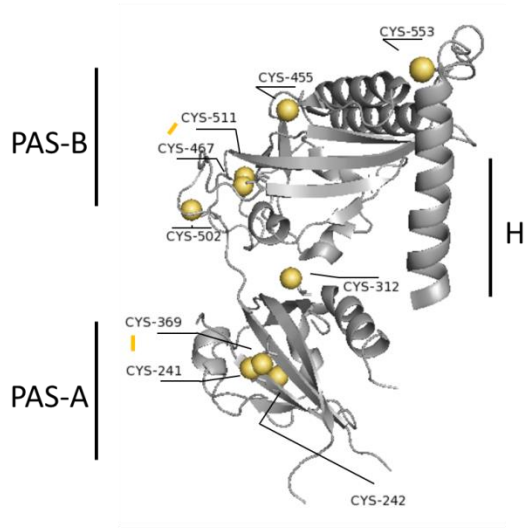
Figura C. Estructuras cristalográficas del subdominio PAS-A de PER2 de ratón. *Izquierda:* se muestra la posición relativa de las cisteínas del motivo CC (cisteínas 308 y 307) en el subdominio PAS-A, los tioles se disponen a 8.6 Å de distancia.

En contraste, el cristal del multímero de PER de Drosophila (dPER) muestra a la Cys241 del motivo CC formando un puente disulfuro intramolecular con la Cys369 (Fig. D.I.), ambas expuestas en superficie (Fig. D. II). Otro puente disulfuro se encuentra establecido entre las Cys467 y Cys511 en el subdominio PAS-B en dPER; sin embargo, tal puente no ocurriría en ninguna de las PER de mamífero: Cys511 en moscas se encuentra conservada en mPER2 (Cys447), pero no en mPER1 o mPER3; y la Cys467 se encuentra en la secuencia de PER1 y PER3, pero no en PER2. Los puentes disulfuro intramoleculares en el domino PAS de moscas podrían estar relacionados con el alto grado de empaquetamiento al presentarse el cristal como un multímero de ocho moléculas.

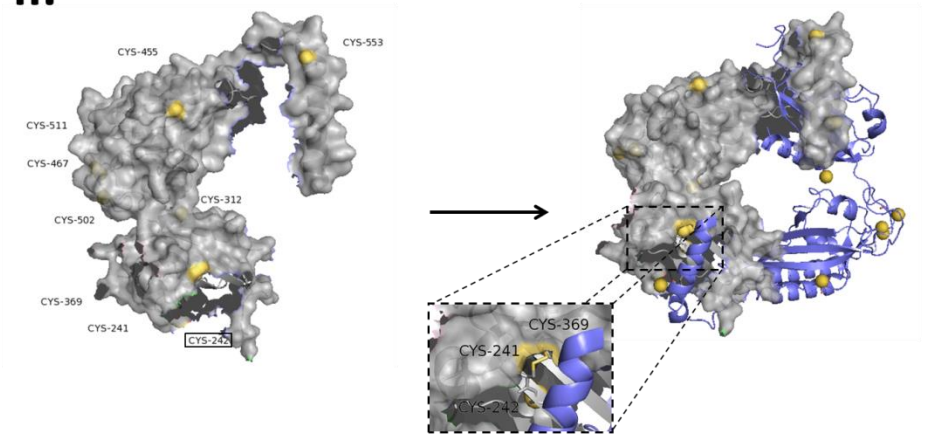
Si bien el cristal del dominio PAS de dPER no presenta puentes disulfuros intramoleculares, la presencia de moléculas del agente reductor DTT (ditiotreitol) co-cristalizadas con el multímero podría estar explicando esta ausencia. En este sentido, dPER presenta nueve cisteínas en el dominio PAS, ocho de ellas en superficie, posicionándose mayoritariamente en una de las "caras" del cristal (Fig. D. III.). Al estar éstas cisteínas reducidas por acción del agente reductor, se hipotetiza que un mejor empaquetamiento podría estar favorecido por oxidación de cisteínas causadas por ROS/RNS (Fig. D. IV).

Figura D. Estructura cristalográfica del dominio PAS de PER de Drosophila. I. Se muestra la estructura del monómero, se indica el subdominio PAS-A y PAS-B, además de la hélice f α. En esferas amarillas se muestran los tioles y los puentes disulfuro establecidos para las cisteínas 369-241 (PAS-A) y 511-467 (PAS-B). Las cisteínas consecutivas en secuencia 241 y 242 corresponden al motivo CC. **II.** *Izquierda:* se muestra la superficie del monómero, solo la Cys242 (recuadrada) no se encuentra disponible al solvente. *Derecha:* se muestra el dímero y se resalta la posición relativa del puente disulfuro 369-241. **III.** Las dos caras del dímero, en solo una de ellas se observan tioles libres en superficie reducidas por acción del agente reductor DTT (en rojo). **IV.** Las caras con tioles libres reducidos son las que se enfrentan en el multímero cristalizado.

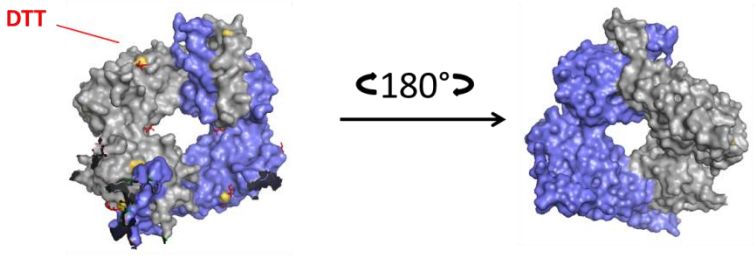
I.



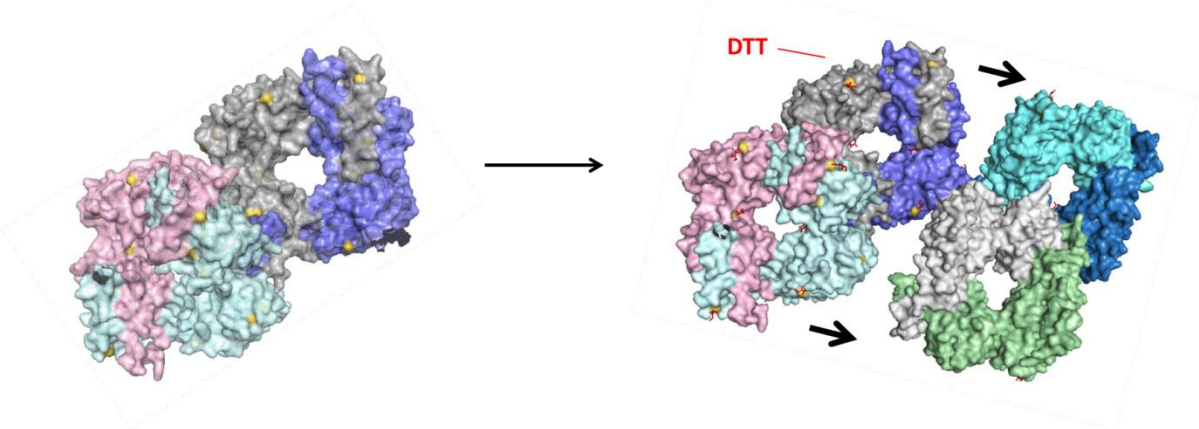
II.



III.



IV.



Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

El alineamiento de secuencia entre moscas y mamíferos para la Cys369 que se encuentra formando el puente disulfuro en el subdominio PAS-A con el motivo CC en dPER no encuentra homología; sin embargo, estructuralmente hablando, se podría suponer que la Cys262 en PER2 podría estar generando la misma modificación post-traduccional (Fig. E). Lamentablemente, el cristal de mPER2 carece de resolución para tales cisteínas [la región desde el aminoácido 251 al 264 no fue cristalizada (Fig. F)]. En cambio, la homóloga Cys202 en PER3 se encuentra resuelta en el dímero cristalizado de esta proteína, y si bien se posiciona a una distancia mucho mayor a la consenso [5 Å (Fig. E)], su mayor "movilidad" al localizarse en un espiral al azar permitiría establecer proximidad en estas cisteínas *in vivo*. Además, si se toma en cuenta los extremos circundantes a la región faltante en PER2 (aminoácidos 250 y 265), se podría suponer que lo mismo ocurriría en esta proteína (Fig. E). En otras palabras, a pesar de que la secuencia no es la misma, la posición de los aminoácidos se asemejan, permitiendo suponer que el puente disulfuro intramolecular observado en dPER podría ser hipotetizado para PER2. Vale la aclaración que PER1 no posee la cisteína conservada que mediarían el puente intramolecular en PER3 y PER2. Esta observación podría estar explicando lo descripto por otros investigadores, donde la homodimerización ocurre principalmente en PER2 y en menor medida PER3 pero no en PER1 [404].

```
dPER        TPSITDVLGYPRDMWLGRSFIDFVHLKDRATFASQITT-GIPIAE---SRGSV---PKDA
hPER3       SEQAALILNRKKDVLASSHFVDLLAPQDMRVFYAHTARAQLPFWNNWTQRA-ARYECAPV
mPER3       SEQAALILNSKRGFLKSVHFVDLLAPQDVRAFYAHTAPTQLPFWNNWTQRA-SQYECAPA
hPER1       SEQAAVLLRCKRDVFRGTRFSELLAPQDVGVFYGSTAPSRLPTWGTGASAGSGLRDFTQE
mPER1       SEQAGVLLRCKRDVFRGARFSELLAPQDVGVFYGSTTPSRLPTWGTGTSAGSGLKDFTQE
hPER2       SDQVASIFHCKRDAFSDAKFVEFLAPHDVGVFHSFTSPYKLPLWSMCSGADSFTQECMEE
mPER2       SNQVASIFHCKKDAFSDAKFVEFLAPHDVSVFHSYTTPYKLPPWSVCSGLDSFTQECMEE
            : .   ::   :.   .  * ::::  :*  .* .  :   :*
```

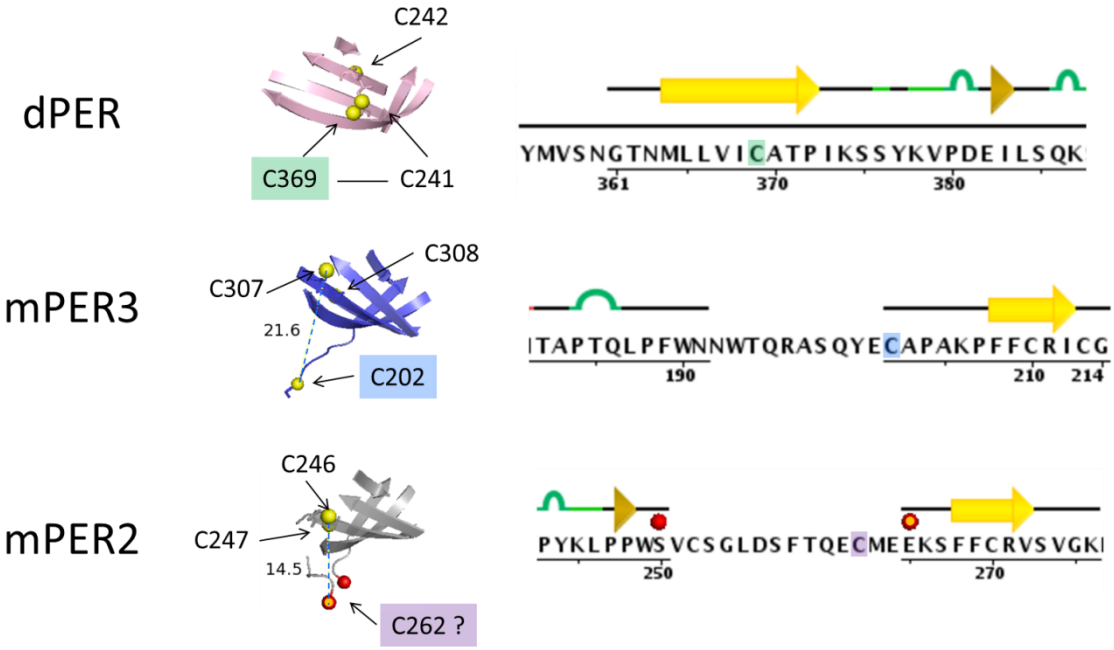
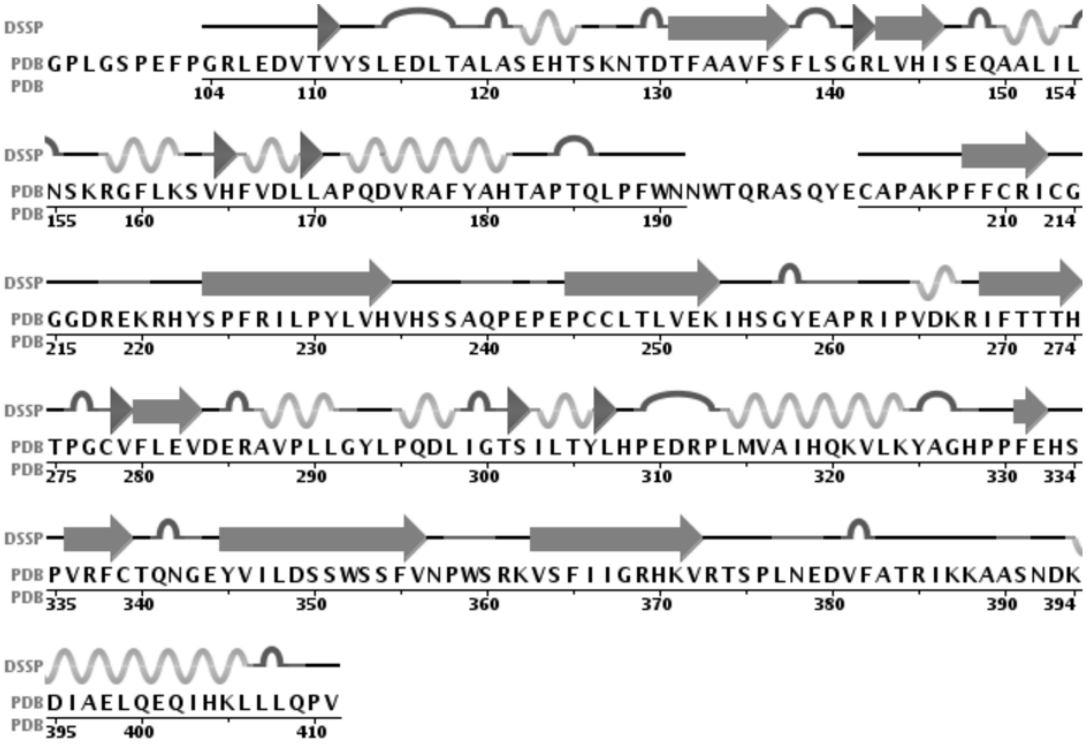


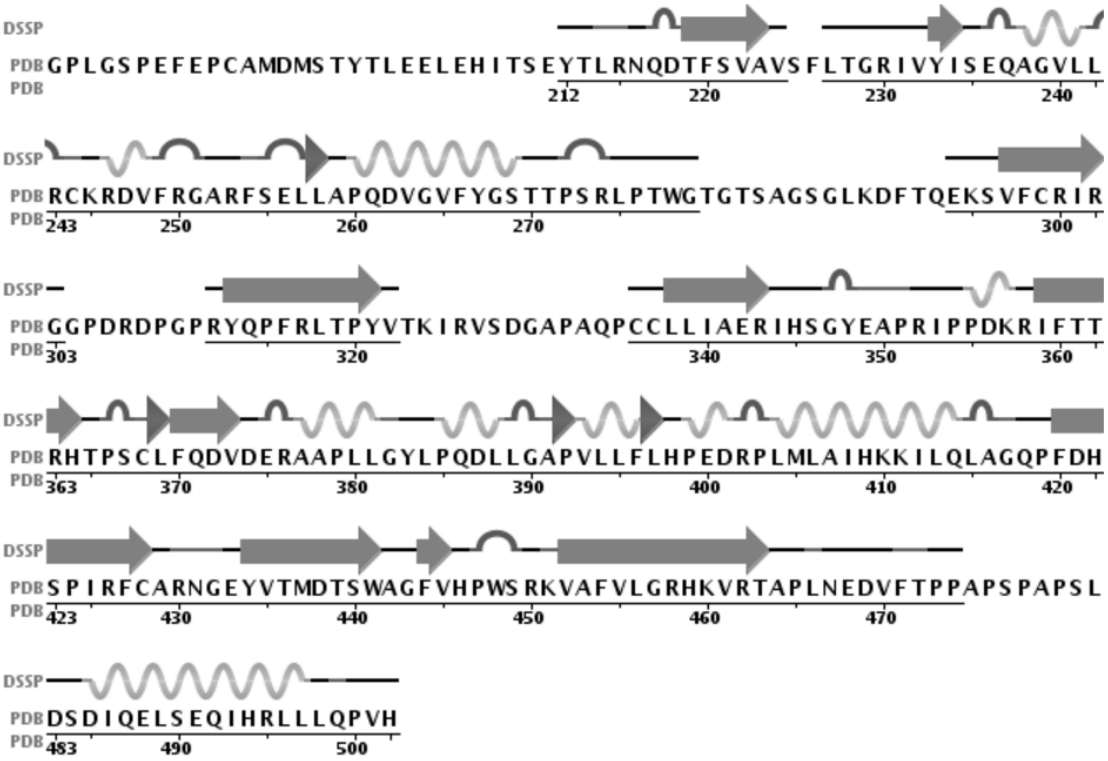
Figura E. Comparación del subdominio PAS-A de PER de Drosophila con PER2 y PER3 de ratón. *Arriba:* se muestra una fracción del alineamiento de secuencias para dPER y mPER1/2/3 obtenido por ClustalOmega. Se resaltan en azul y violeta las cisteínas (C) 202 y 262 de PER3 y PER2, respectivamente. *Abajo izquierda*: se muestran las estructuras del subdomino PAS-A de cada proteína; se resalta el puente disulfuro entre C369 (verde) y C241 del motivo CC en dPER y en azul y violeta las cisteínas candidatas en PER2 y PER3. Se indica también las distancias relativas entre la C202-C307 en PER3 y C262-C246 en PER2. *Abajo derecha:* porción de la secuencia cristalizada, la discontinuidad de la línea superior a la secuencia indica falta de cristalización de esa región. La esfera roja y roja/naranja en la estructura de PER2 a la izquierda resultan los aminoácidos indicados en la secuencia correspondiente de la derecha.

Figura F. Secuencia cristalizada para cada proteína. Entre paréntesis se indica el código para la búsqueda en la base de datos (http://www.rcsb.org). La región discontinua de la fila DSSP corresponde a regiones que no resultaron cristalizadas.

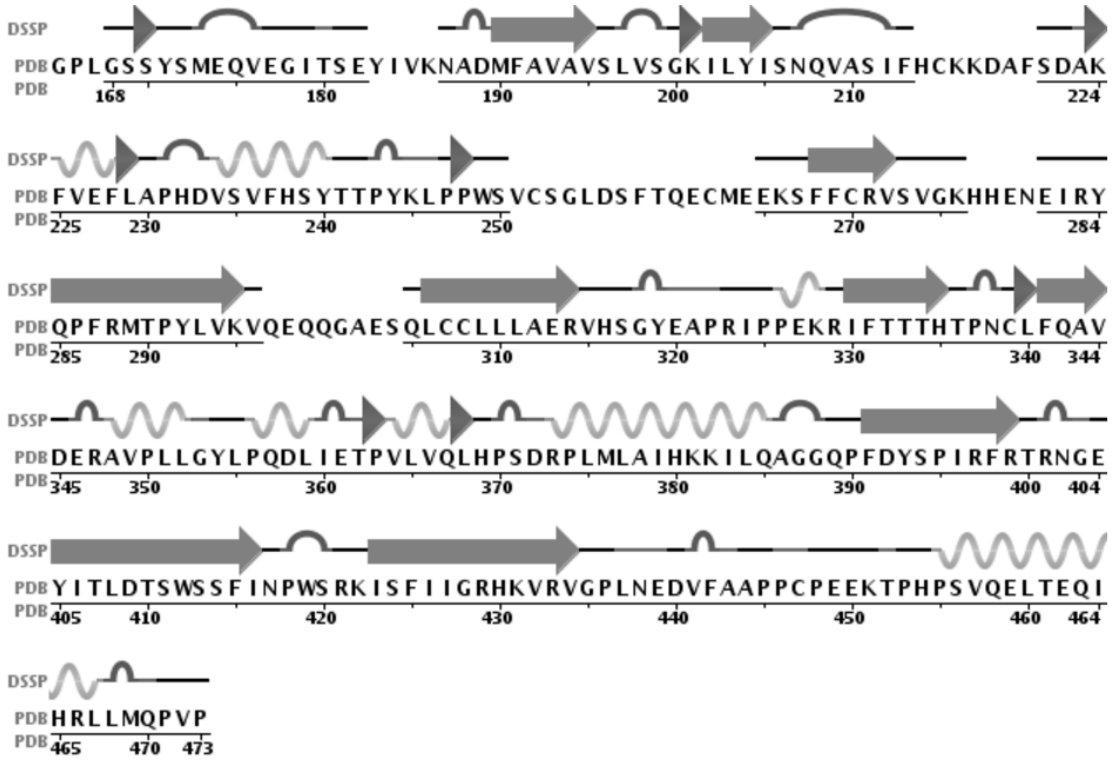
PER3 (4dj3)



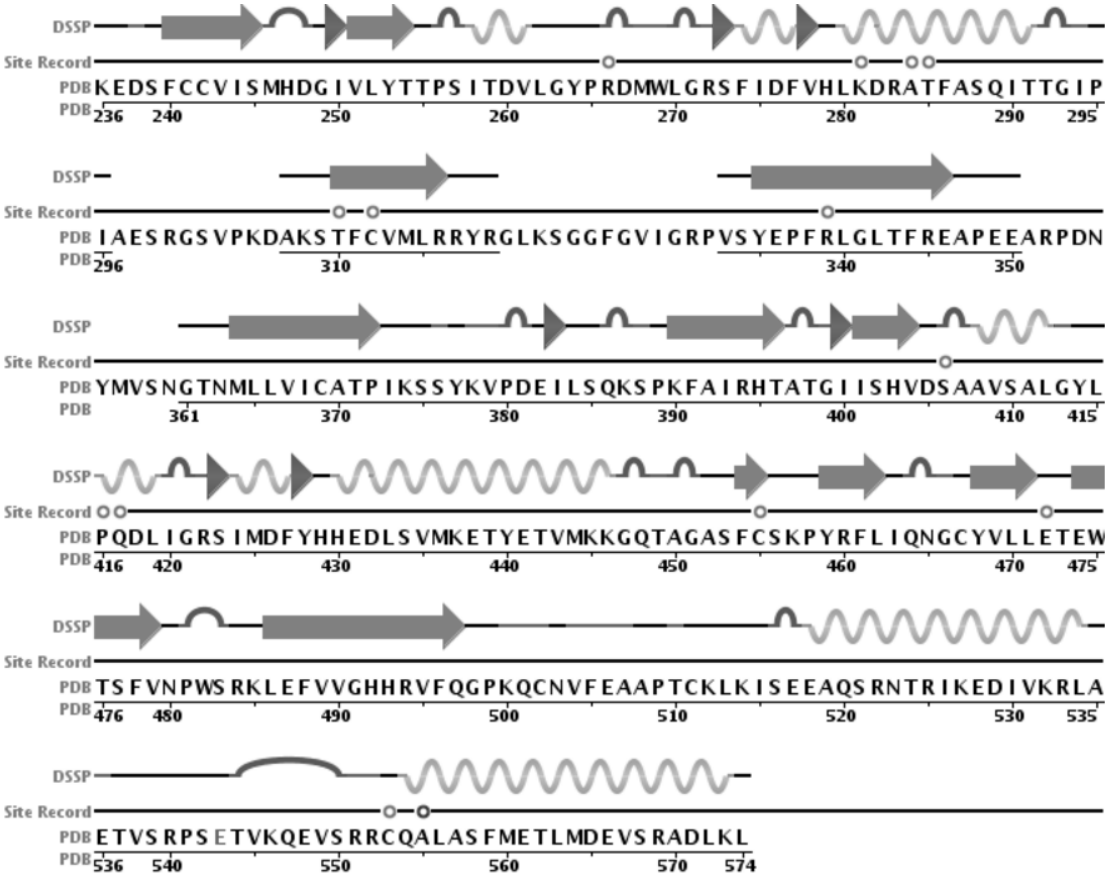
PER1 (4dj2)



PER2 (3gdi)



dPER (4rty)



Hasta aquí, la descripción del potencial puente disulfuro intramolecular en PER2 por comparación con dPER y PER3, permitirían suponer que tal modificación generaría una estructura pro-homodimerización. En este sentido, por comparación del subdominio PAS-A de moscas y ratones, el puente en dPER generaría una torsión por acercamiento de sus hojas beta, que se traduce al mismo tiempo en un alargamiento global del subdomino (Figura G).

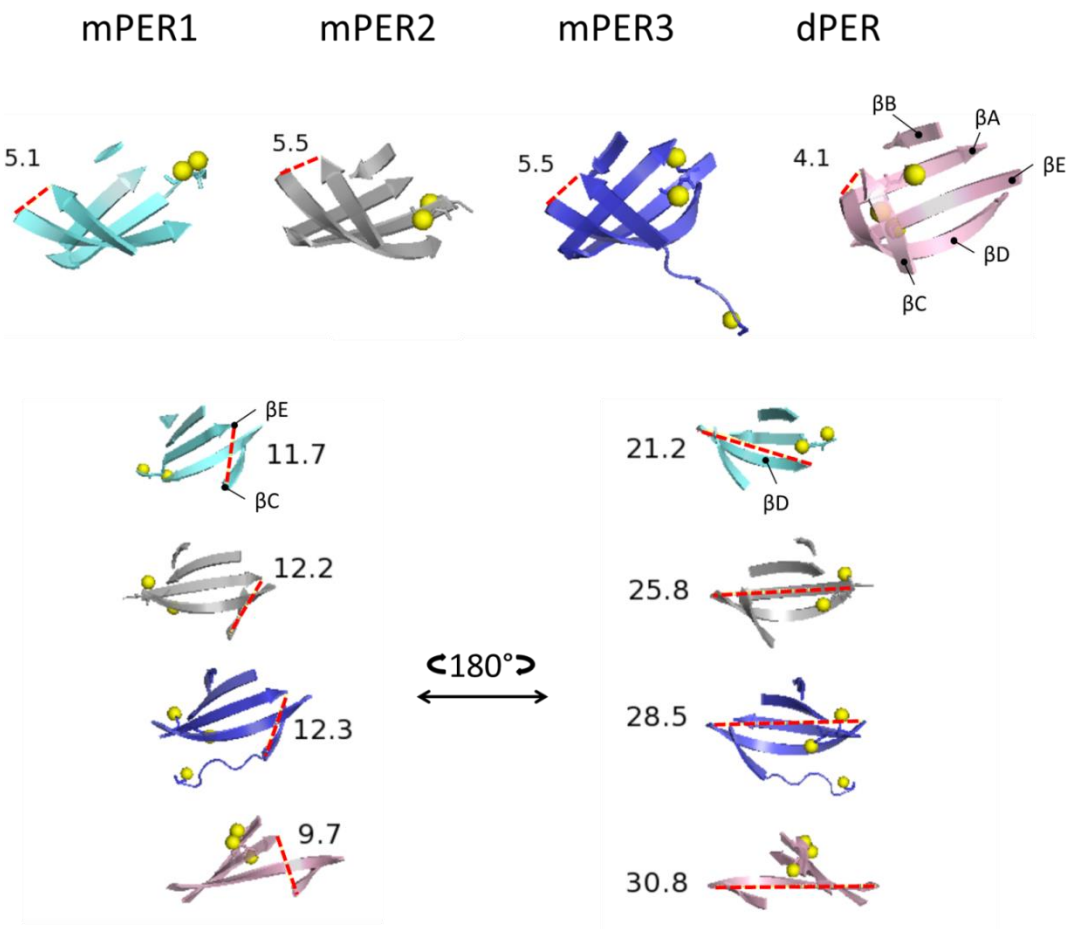


Figura G. Distancias medidas en los subdominio PAS-A de PER de Drosophila y PER1/2/3 de ratón. El puente disulfuro en dPER genera que las hoja βC se encuentre más próxima βE (abajo izquierda) y βD (arriba). A su vez, se observa un alargamiento de βD (abajo derecha), la hoja más extensa del subdominio.

La re-estructuración intramolecular de PER2 podría estar explicando la observación *in vitro* de dimerización/multimerización de PER2 dependiente de S-nitrosilación/oxidación de cisteínas (Capitulo III).

Si bien los procesos de heterodimerización no fueron estudiados en esta tesis, no se puede dejar de tener en cuenta la estabilización del heterodímero CRY1:PER2 y CRY2:PER2 por el tetratiolato de Zn2+ ("dominio dedo de Zn"). Este catión divalente se encuentra coordinado por dos cisteínas de PER2 (Cys1210, Cys1213) y una histidina y cisteína en CRY (His473 y Cys424 en mCRY1) [247, 248] La mutación de cualquiera de estos residuos coordinadores significativamente debilita la formación del complejo CRY1-PER2 *in vitro* por reducción en la incorporación de zinc [247]. A su vez, ratones transgénicos que constitutivamente sobre-expresan CRY1 con la mutación Cys414Ala en la interface del zinc, muestra un período endógeno de 28h, con síntomas de diabetes incluyendo la reducida producción de insulina [422-424]. De esta manera, la heterodimerización dependiente de zinc de CRY1:PER2 resulta importante para la dinámica circadiana y la regulación metabólica.

En la estructura cristalográfica de apo-CRY1, la Cys412 adyacente a la Cys414 que coordina el átomo de zinc, forma un puente disulfuro intramolecular con la Cys363 localizada en las cercanías del dominio de unión a FAD, el cual se encuentra obstruido en la estructura del complejo CRY1-PER2. A pesar de su localización en el reducido ambiente del citosol o nuclear, CRY1 presenta puentes disulfuro *in vitro*, sugiriendo que la unión Cys412-Cys363 podría tener un rol *in vivo* [247]. La comparación de las estructura sugiere además, que la reducción del puente disulfuro facilita la unión a PER2, aumentando la flexibilidad necesaria para generar los cambios conformacionales necesarios para la heterodimerización. [387]. Sin embargo, mutaciones individuales de las cisteínas involucradas en el puente disulfuro no afectan su actividad como represor transcripcional [248] ni su unión a PER2. Solo la sumatoria de mutaciones con las cisteínas que coordinan al zinc afecta la interacción CRY1-PER2. La oxidación intramolecular observada en CRY por depleción de zinc, permite suponer un efecto desestabilizante en el complejo CRY-PER [247]. Por el contario, si bien existen las correspondientes Cys conservadas en CRY2 (Cys430 y Cys 381), tales no parecen sufrir oxidaciones intramoleculares; en cambio, CRY2 forma puentes disulfuro intermoleculares con FBXL3 [425] (Fig. 13). De esta manera, Cys412 en mCRY1 y Cys430 en mCRY2 ambas muestran reactividad redox, pero muestran sensibilidades redox diferente, al menos en las estructuras obtenidas hasta la fecha.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

BMAL1

Para el caso de BMAL1, esta proteína ha sido cristalizada formando el complejo heterodimérico con CLOCK. El complejo se genera través de la interacción dual de los dominios PAS y básico Hélice Giro Hélice (bHLH) presentes en ambas proteínas. A diferencia de las proteínas PER que no contienen el dominio bHLH funcional, BMAL1 y CLOCK se unen directamente al DNA gracias a él.

Es reconocido el rol que cumple el dominio bHLH en la dimerización de factores de transcripción para lograr su unión al ADN [426]. Si bien este dominio se presenta en muchos factores, algunos pueden ser modulados por fosforilaciones, otros por oxidación de cisteínas o por una combinación de ambas [427]. Llevando a ciertos autores a plantear una regulación redox/estrés oxidativo sobre la actividad estos factores de transcripción [428, 429].

El cristal para el heterodímero CLOCK:BMAL1 no presenta puente disulfuro intermoleculares. Sin embargo, BMAL1 (y el homólogo en moscas CYCLE), posee una cisteína conservada en la región bHLH (Cys102 en ratón, Fig. H). Por lo tanto, se podría suponer que para el caso de la homodimerización de esta proteína tales cisteínas podrían estar mediando este proceso

Suponiendo entonces que la oxidación en la Cys102 sería la encargada de generar el puente disulfuro intermolecular, se utilizó la estructura cristalográfica del complejo heterodimérico con CLOCK para modelar un posible homodímero de BMAL1 (Fig. I). La disposición de las Cys102 a una distancia consenso de 5Å, genera que la conservada Cys240 (también está presente en CYC) de la región *interlinker* entre PAS-A y PAS-B queden a una distancia de 1.3 Å.

Sorprendentemente el homodímero de BMAL1 permite el acople del homodímero de CLOCK. En similitud con lo planteado en la Figura 62 del capítulo III [407], el multímero no permitiría la unión con el ADN (Fig. J). De esta manera el multímero no sería biológicamente funcional para la transcripción como ya se discutió anteriormente.

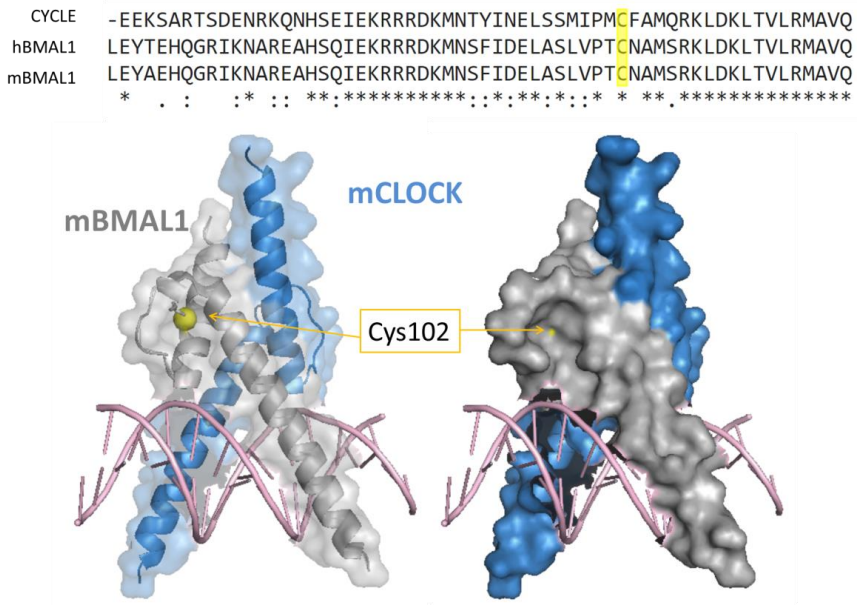


Figura H. BMAL1 posee una cisteína conservada en el dominio bHLH. *Arriba:* se muestra el alineamiento de secuencia obtenido por ClustalOmega para las proteínas BMAL1 de ratón y humano, y el homólogo en Drosophila CYCLE. *Abajo*: se muestra la estructura cristalográfica del dominio bHLH del heterodímero CLOCK (azul): BMAL1 (gris) uniéndose a una doble hebra de ADN de un sitio E-Box (rosa). Abajo a la derecha se muestra la superficie del heterodímero, y a la izquierda la misma imagen pero con la superficie transparentada para mejor visualización de la cisteínas 102.

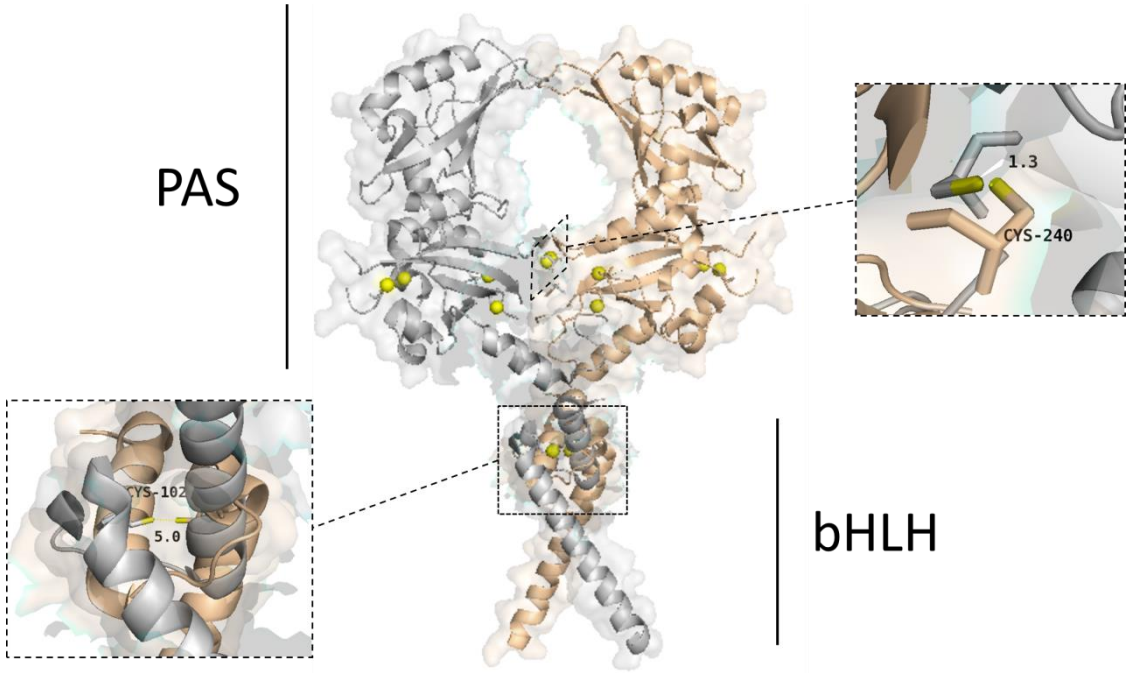


Figura I. Modelo propuesto para el homodímero de BMAL1 de ratón. Se muestran en gris y beige dos moléculas de la misma proteína con la superficie transparentada. Los recuadros corresponden a las cisteínas conservadas en moscas y mamíferos: C240 (arriba) y C102 (abajo). La disposición del dímero se decidió partiendo de la premisa de posicionar a las C102 del bHLH de ambas moléculas a una distancia de 5 Å.

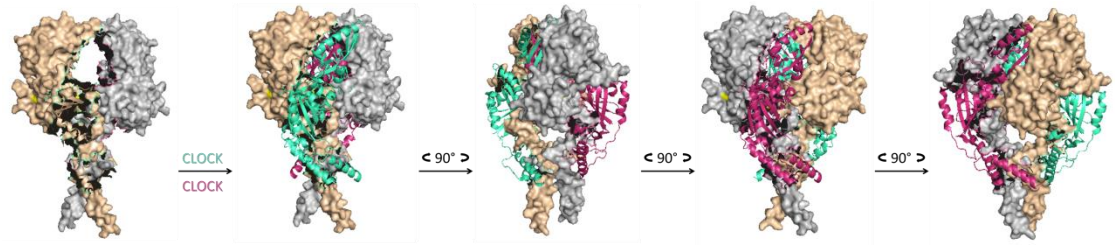


Figura J. Multímero de BMAL1 y CLOCK. La disposición del homodímero de BMAL1 (gris-beige) es permitida por la disposición en espejo de CLOCK (verde-magenta).

En semejanza con lo que se postula para PER2, BMAL1 también podría presentar puentes disulfuros intramoleculares en el subdominio PAS-A. En particular las Cys280 en la hoja beta E y Cys253 se posicionan a 3.2 Å de distancia y se encuentran ambas expuestas en superficie. A pesar que la Cys164 no se encuentra expuesta, su estructuralmente vecina Cys313 que se dispone a 6.2 Å sí (Fig. Q). La disposición de estos pares de cisteínas en los extremos de las hojas beta, nuevamente permiten suponer la hipótesis de torsión y alargamiento de la estructura. De esta manera, se hipotetiza que tanto puentes intra- e inter-moleculares estarían logrando la homodimerización de BMAL1 (Fig. K).

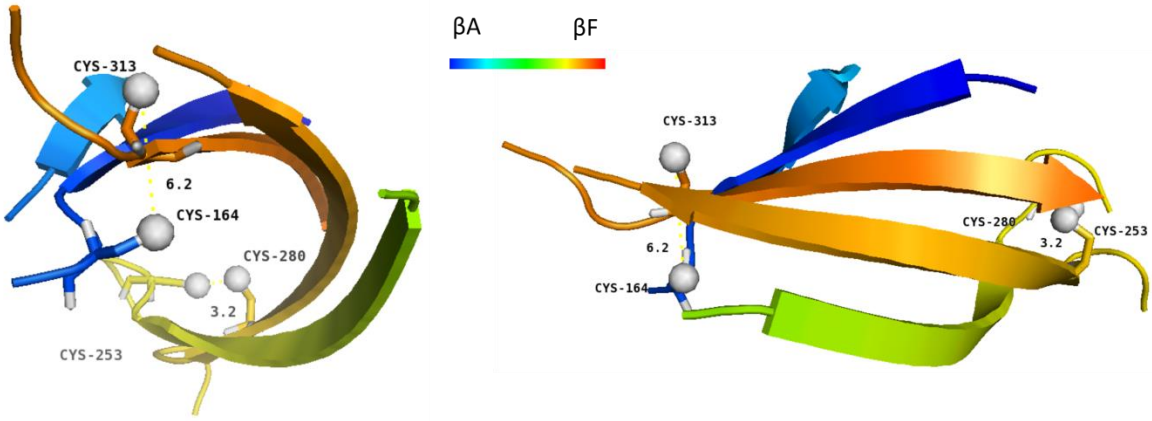


Figura Q. Cisteínas presentes en el subdominio PAS-A de BMAL1 de ratón. Se observan cuatro cisteínas en la estructura, posicionándose en los extremos del motivo. Las cisteínas 280 y 253 se posicionan a una distancia de 3.2 Å. La esfera de color gris corresponde al tiol de la cisteína.

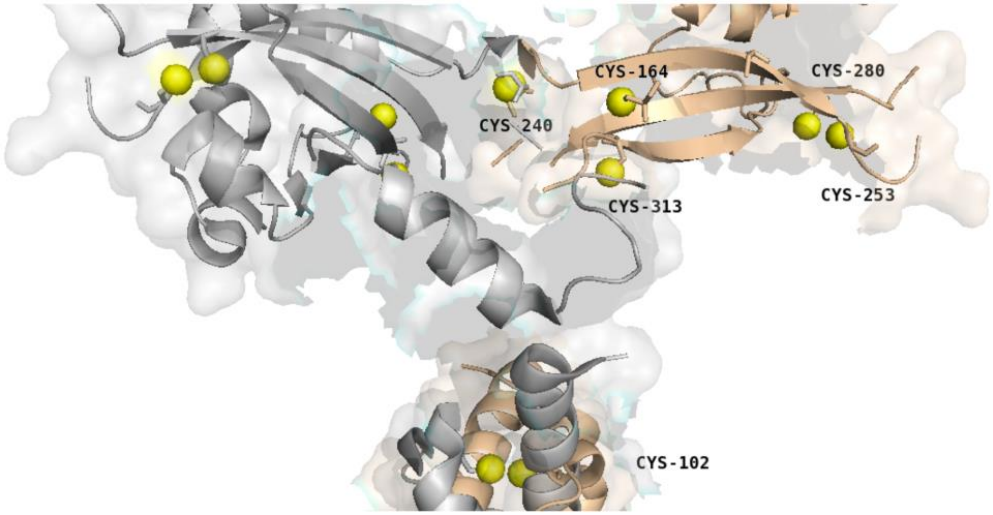


Figura K. Cisteínas en bHLH y PAS-A en el homodímero propuesto para BMAL1. A modo de resumen se muestran las cisteínas con potencialidad de mediar puentes intramoleculares que permitirían un mejor acoplamiento de los subdominios PAS-A (cisteínas 164, 280, 253 y 313); y también aquellas que mediarían puentes intermoleculares en el ya establecido mecanismo para bHLH (C102) como en una región interlinker (C240) de los subdominios en PAS.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

El ciclo ambiental de luz/oscuridad de 24 horas ha sido un factor determinante durante la evolución y, de hecho, la aparición de un sistema que permitiese establecer una sincronía con este ambiente, ocurrió bien temprano en el árbol de la vida.

El sistema circadiano, aquel que permite la sincronización con el ambiente oscilante de 24h, ha sido estudiado a nivel químico, físico, molecular, fisiológico, y hasta poblacional y social. En mamíferos, los NSQ se sincronizan al ciclo de LO gracias a la fotorecepción en la retina, la cual transduce la información lumínica principalmente como un impulso excitatorio glutamatérgico. La cascada de transducción de señales que permite que las neuronas del reloj central se sincronicen es foco de investigación de esta tesis.

Teniendo en cuenta la relevancia del NO en la sincronización de los ritmos circadianos, se propuso evaluar las propiedades cronobióticas del compuesto N-nitrosomelatonina (NOMel) [430]. Este compuesto resultó potenciar solamente la vía de adelantos a CT18, careciendo de efecto en la de retrasos a CT14, fenómeno comprobado tanto a nivel comportamental en protocolos de pulsos de luz, de cambios abruptos en el ciclo de luz/oscuridad (*jet lag* experimental), como en la medición de PER1 en cortes histológicos de los NSQ del hámster. A diferencia de la NOMel, el fármaco SNAP había demostrado previamente potenciar ambas vías de sincronización. Si bien ambos compuestos liberan en solución acuosa ●NO, NOMel tendría menor capacidad de S-nitrosilar *in vivo*. Dicha hipótesis se basa en el hecho de que una S-nitrosilación sería el resultado de una trans-S-nitrosilación, en el que un compuesto S-nitrosilado cede su grupo nitro a la cisteína blanco. Para poner en evidencia si éste es en realidad el mecanismo, se decidió emplear Sal de Angeli [Na2(ONNO2)], un dador de nitroxil (NO^-), cuya carga negativa le confiere *a priori* una mayor tiofilicidad (facilitando el ataque nucleofílico sobre el sulfuro de las cisteínas) pero al mismo tiempo incapaz de generar una trans-S-nitrosilación. Al igual que lo que ocurrió con NOMel, este compuesto solo potenció la vía de lo adelantos. Es por ello que se propone que solo aquellos compuestos que posean la capacidad de liberar NO como mensajero gaseoso, y que sean del tipo S-nitrosotioles, podrán potenciar ambas vías (Tabla 5). Para poner a prueba dicha predicción, se empleó a continuación Glutatión-S-nitrosilado (GSNO), un

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

potencial segundo mensajero producido por la nNOS. Efectivamente, el tratamiento con GSNO potenció la sincronización por pulsos de luz tanto a CT14 como a CT18, probablemente promoviendo tanto la vía intra- (la apertura del RyRII) como extra-celular (NO como neurotransmisor gaseoso-activador de sGC). Este resultado se encuentra en concordancia con lo propuesto por otros investigadores, que plantean una mayor sensibilidad del RyRII por GSNO que por NO [431, 432].

TABLA 5. Clasificación de los compuestos oxidantes nitrérgicos y antioxidantes empleados en esta tesis. La acción oxidante (Ox.) y antioxidantes (AntiOx.) de NOMel radica en su accionar dual de dador de NO radical (●NO) y de hormona antioxidante melatonina. S-NO: S-nitrosilación.

	Referencia	Agente	Produce	Acción sobre S-NO
N-nitrosomelatoina	NOMel	Ox. y AntiOx.	●NO	Trans-S-nitrosilador poco eficiente
S-nitrosoglutatión	GSNO	Ox.	●NO	Trans-S-nitrosilador
S-nitrosocisteína	CysNO	Ox.	●NO	Trans-S-nitrosilador
Sal de Angeli	SA	Ox.	NO^-	Trans-S-nitrosilador poco eficiente
Glutatión reducido	GSH	AntiOx.	GSH	Des-S-nitrosilador
L-acetil-N-cisteína	LNAC	AntiOx.	GSH	Des-S-nitrosilador

Previamente, nuestro laboratorio demostró que el secuestro del NO extracelular bloquea los adelantos de fase inducidos por luz a CT18, pero no los retrasos a CT14. Sin embargo, la inhibición de la actividad de la NOS bloquea el efecto del pulso a ambos CTs. Una posible explicación de estos resultados considera la producción de diferentes mensajeros al comienzo o al final de la noche. En este sentido, se ha propuesto que NOS podría producir GSNO en vez de NO gaseoso, dependiendo de la concentración de glutatión (GSH). Debido a que el GSH es un componente principal del sistema redox celular, la diferencia observada entre CT14 y CT18 podría deberse a una diferencia en el estado redox neuronal entre estos dos CTs. Teniendo en cuenta esto, se procedió a medir en muestras de los NSQ del hámster el par redox de glutatión GSH/GSSG. La medición demuestra efectivamente un incremento en el estado oxidado en la noche tardía del animal. Es decir, el hecho de que exista un estado redox que oscila, le permitiría al reloj central, frente a un mismo estímulo, disparar diferentes cascadas de transducción de señales: la bifurcación que ocurre a nivel de la nNOS podría deberse a cambios redox-dependientes de la actividad de la enzima. Por lo tanto, frente a un

estado reducido (es decir, GSH>GSSG) se haría viable una cascada de trans-S-nitrosilación, donde el producto más probable de la actividad de la nNOS sea GSNO; en cambio, en un estado más oxidado (GSH<GSSG) la vía utilizaría NO como mensajero gaseoso. De esta manera se podría re-analizar la curva de respuesta de fase (CRF, Fig. 6) para la sincronización por luz redox-dependiente (Fig. 63).

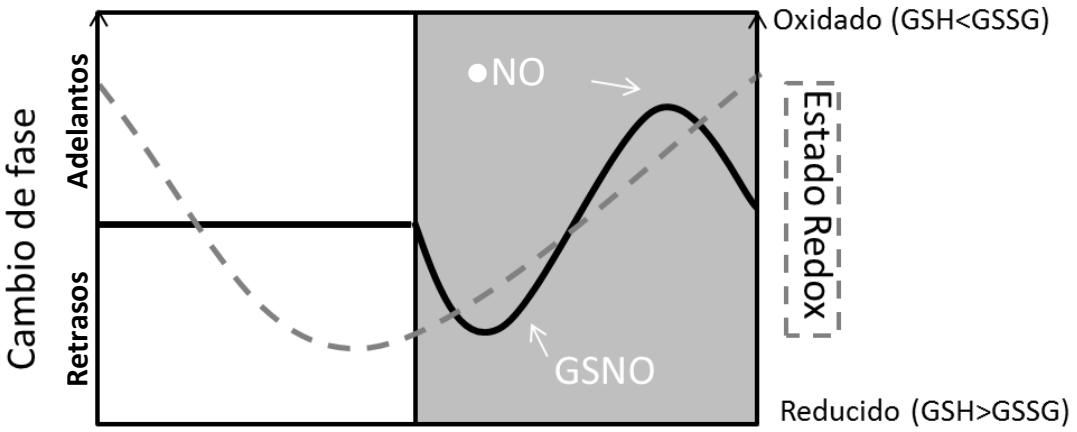


Figura 63. Curva de Respuesta redox-sensible. La línea negra corresponde a la curva de repuesta de fase a pulsos de luz (ver Fig. 6). En la noche temprana se obtienen retrasos, que coindicen con la fase reducida del ritmo redox GSH/GSSG; en la noche tardía, los adelantos coinciden con la fase oxidada. Se indican los posibles mensajeros producidos por acción de nNOS en ambos casos.

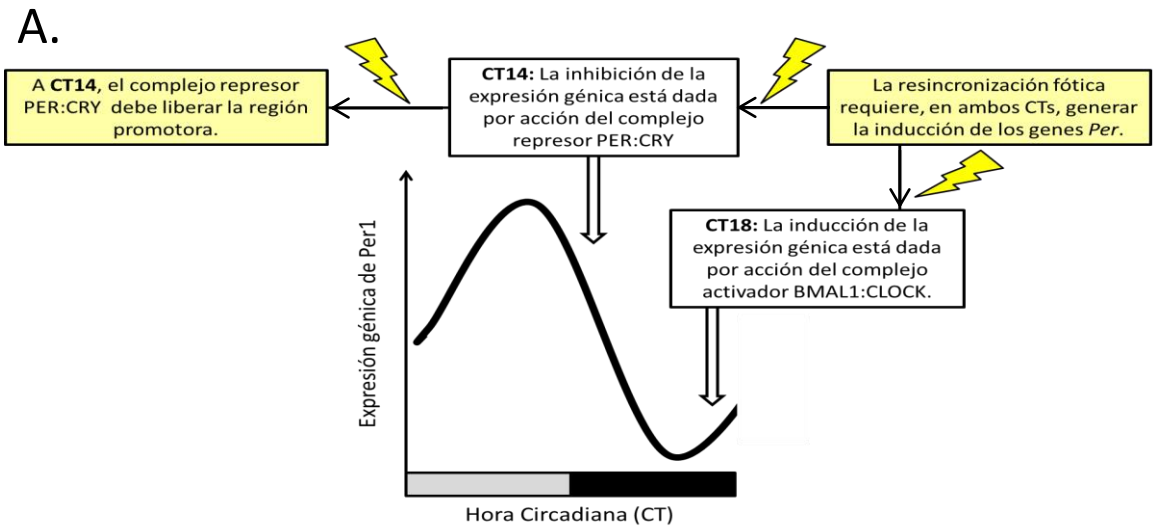
La determinación de un estado redox neuronal posiblemente oscilante, puede ser causa o consecuencia del reloj circadiano molecular. De modo de poder entender mejor el sistema, nos propusimos entonces modificar el estado redox de los NSQ con un reconocido agente antioxidante (L-acetil-N-cisteína -LNAC-), y observar si dicha intervención produce un cambio en el reloj circadiano. La administración de la droga produjo retrasos de fase comportamentales a CT14, resultado que se correlaciona con una mejora en la resincronización por retrasos en protocolos de *jet lag*. Estos resultados son los primeros ensayos *in vivo* que demuestran que agentes antioxidantes modifican la actividad del sistema circadiano. Asumimos que la administración del agente antioxidante al comienzo de la actividad del animal (CT14) generó un retraso en el incremento de las especies oxidadas, retrasando el ritmo de estado redox,

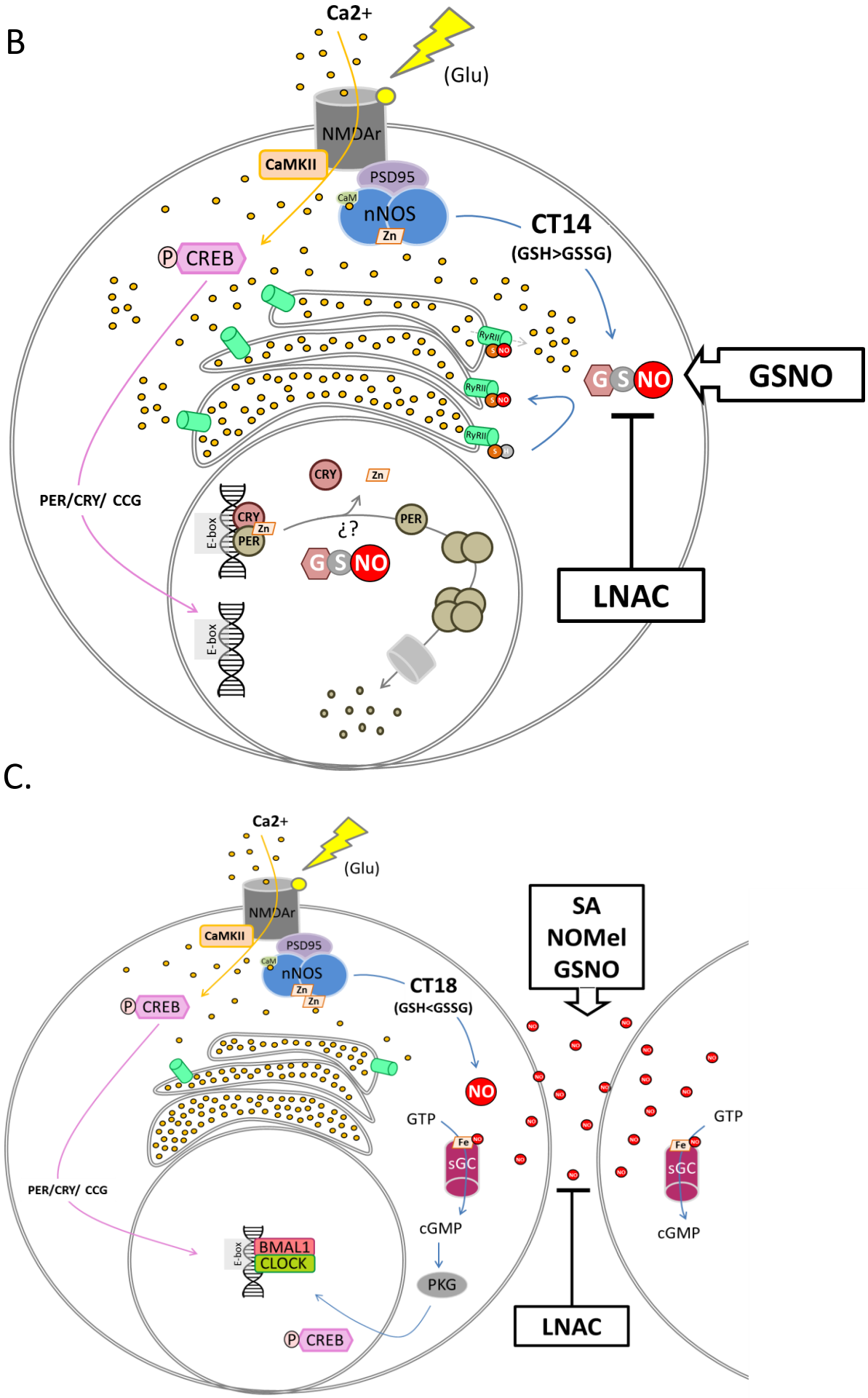
conduciendo a un retraso de todo el sistema en general. En este sentido, y a pesar de que se desconoce el mecanismo, el ensayo preliminar de inducción de PER1 en los NSQ por acción de LNAC indicaría que este agente antioxidante podría modificar directamente la fase del reloj molecular central. En cambio, en la noche tardía (CT18), probablemente el estado oxidado de los NSQ en ese momento no pudo ser modulado con la dosis ensayada (se observa una tendencia a generar retrasos, aunque no significativa).

Por otro lado, nos propusimos evaluar el efecto de LNAC sobre la sincronización fótica del reloj. Animales mantenidos en oscuridad constante recibieron i.c.v. LNAC previo a un pulso de luz a CT14 o CT18. En ambos casos, LNAC atenuó los cambios de fases resultantes. Si bien desconocemos el mecanismo de acción, puede considerarse que LNAC, al ser una cisteína ligeramente modificada, podría ser sustrato de la actividad S-nitrosiladora de NOS titulando tanto a GSNO como a NO (o generando la des-S-nitrosilación de los sustratos RyRII y sGC), interfiriendo la transducción en ambas vías. Esta hipótesis se basa principalmente en la capacidad de la LNAC de atravesar la membrana plasmática, permitiéndole tener un efecto inmediato sobre la cascada activada por luz.

Como se explicó previamente, un hecho importante para el reseteo del reloj por luz, es la inducción de los genes per1 y per2 en los NSQ. Los pulsos de luz inducen la expresión de estos genes tanto a CT14 como a CT18. Para que ello ocurra, factores positivos de transcripción deben unirse a la región promotora del gen (E-box) y, a su vez, los factores negativos deben dejar de inhibir su expresión. Estos factores transcripcionales oscilan circadianamente, y para el caso particular de las proteínas PER1 y PER2, disminuyen a lo largo de la noche. Por lo tanto, a nivel del reloj molecular, otra diferencia importante entre el comienzo y el final de la noche es que a CT14 la activación de la cascada de transducción de señales por luz no solo debe fomentar la unión de los factores positivos sino, además, liberar la región promotora del complejo negativo. Gracias a la reciente determinación de la estructura cristalográfica del complejo represor PER2:CRY1, la cual pone en evidencia un dominio dedo de zinc coordinando al heterodímero, el potencial GSNO producido por la activación fótica de nNOS a CT14 podría generar la disociación del complejo negativo

PER2:CRY1. En particular, hemos corroborado que PER2 sufre S-nitrosilación *in vitro* por acción de otro S-nitrosotiol, CysNO, modificando su estabilidad. A su vez, dicha modificación es el intermediario en la oxidación de cisteínas que conllevan a su posible degradación por dimerización y agregación *in vitro*. Este resultado, es el primero que demuestra que componentes moleculares del reloj circadiano de mamíferos sufren este estilo de modificación post-traduccional redox-dependiente. El estudio *in silico* permitió establecer que para el caso de PER2, los puentes disulfuro intramoleculares permitirían un mejor empaquetamiento favoreciendo su homodimerización. Es por ello que proponemos que la estabilidad del heterodímero podría estar afectada por este mecanismo: la activación por luz de nNOS en los NSQ podría desestabilizar el heterodímero PER2:CRY1 por S-nitrosilación/oxidación en su tetratiolato, permitiendo la homodimerización/agregación de PER2 y su consecuente degradación. Tal proceso permitiría liberar el complejo represor de la región E-box de genes controlados por el reloj, o propios del reloj molecular; al mismo tiempo, se permitiría la inducción de los genes *per* por acción de CREB. Por el contrario, a CT18 la vía extracelular del NO, no permitiría establecer esta regulación S-nitrosilativa sobre el reloj. En cambio, su rol en la sincronización fótica sería actuar como un neuromensajero parácrino gaseoso entre la región ventral/dorsal. En la Figura 64 se muestra un posible modelo basado en los resultados obtenidos en esta tésis, considerando la acción de los fármacos empleados, sus posibles blancos, y los mensajeros fóticos.





Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

Figura 64. Resumen de la modulación farmacológica de la sincronización fótica circadiana en mamíferos. A. Pulsos de luz tanto a CT14 como a CT18 deben inducir la inducción del gen Per1 en las neuronas de los NSQ para sincronizar al reloj circadiano. Sin embargo, debido a la oscilación en la expresión de este gen dos situaciones distintas se encuentran a CT14 y CT18. Mientras que a CT14 la región promotora del gen se encuentra ocupada por el complejo represor PER:CRY (generando la disminución del transcripto en la noche temprana); a CT18, el complejo positivo CLOCK:BMAL1 promueve su expresión. Por lo tanto, para el caso de CT14 el pulso de luz debe generar la liberación del complejo represor para inducir la expresión de Per1 necesaria para la sincronización fótica. En B. se muestra un esquema de una neurona del reloj central que recibe la señal fótica como un impulso glutamatérgico. El incremento intracelular de Ca2+ por apertura del receptor de NMDA promueve la activación de CamKII y nNOS. La fosforilación de CREB mediaría el proceso de resincronización por inducción génica de los factores PER, al igual que los genes controlados por el reloj. A CT14, un estado redox celular más reducido (GSH>GSSG) generaría que nNOS produzca Glutatión-S-nitrosilado (GSNO), quien podría estar mediando la apertura del receptor de rianodina tipo II (RyRII) en el retículo endoplasmático por mecanismos de trans-S-nitrosilación. Gracias a los ensayos in vitro se hipotetiza que este mismo mecanismo podría estar ocurriendo también en el núcleo, en particular podría liberar el complejo represor PER:CRY de la región E-Box por S-nitrosilación del dominio tetratiolato de zinc (Zn) causando la dimerización/agregación de PER. Por el contrario, el estado redox oxidado a CT18 (B. GSH<GSSG) promueve la generación de óxido nítrico (NO) como mensajero gaseoso, permitiendo la activación por coordinación del grupo hemo del sitio activo de Guanilato Ciclasa soluble (sGC) tanto en la misma neurona como en vecinas. La activación de la quinasa dependiente de cGMP (PKG) podría mediar los adelantos modulando el estado de fosforilación de CREB. Tanto en **B.** como en **C.** se muestra la posible modulación farmacológica de las cascadas de transducción de señales. Brevemente, los dadores de óxido nítrico radical o nitroxil promueven la comunicación extracelular (NOMel, GSNO, SA y SNAP), en cambio solo los dadores del estilo S-nitroso (GSNO y SNAP) promoverían además la cascada de trans-S-nitrosilación. A su vez, LNAC podría estar actuando tanto intra como extracelularmente en la comunicación río debajo de la nNOS.

Este modelo se asemeja al propuesto para la sincronización de relojes circadianos evolutivamente más antiguos. Por ejemplo, en cianobacterias, la oxidación rítmica de quinonas en el comienzo de la noche [391] promueve la degradación del componente positivo KaiA por procesos de agregación [433, 434] permitiendo sincronizar el reloj circadiano al ciclo de LO [435]. Para el caso de la sincronización fótica de *Neurospora crassa*, la luz promueve la hetero- y homo-dimerización del componente negativo Vivid (VVD), compitiendo con el complejo activador del reloj de este hongo [436].

De esta manera se postula que la sincronización fótica del reloj circadiano en mamíferos mantendría una estrategia similar. Desde esta manera, los relojes circadianos de los orgnismos se sincronizarían a la luz (y posiblemente, a otros estímulos) en parte regulando la cinética de dimerización/agregación de sus componentes sensibles al estado redox. El reloj circadiano detecta la principal clave temporal y la traduce a su marcapasos de transcripción/traducción modulando la producción/degradación de sus componentes. Si bien los organismos se han complejizado aumentando el número de componentes moleculares que conforman el reloj, o anatómicamente segregando el sistema fotorreceptor del reloj central, las semejanzas son mayores que las discrepancias. De esta manera, se pone en evidencia la importancia de este sistema para la fisiología circadiana de la vida, que comenzó hace 3.500 millones de años en este planeta Tierra oscilante de 24 horas.

Finalmente, la modulación de la sincronización fótica circadiana en mamíferos permitió no solo establecer cuáles son los mecanismos involucrados en este proceso fisiológico, sino que también permite postular potenciales agentes cronobióticos. En particular, los ensayos con los agente antioxidantes volcados en este trabajo resultan los primeros ensayos *in vivo* donde se comprueba esta propiedad cronobiótica para este estilo de compuestos. Se postulan entonces a estos fármacos para futuros ensayos de terapias cronomoduladas para el tratamiento de trastornos cronobiológicos.

BIBLIOGRAFÍA

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto

BIBLIOGRAFÍA

1. Roenneberg, T. and M. Merrow, *Circadian clocks - the fall and rise of physiology.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(12): p. 965-71.
2. Aschoff, J., *Exogenous and endogenous components in circadian rhythms.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1960. **25**: p. 11-28.
3. Aschoff, J., *Human circadian rhythms in activity, body temperature and other functions.* Life Sci Space Res, 1967. **5**: p. 159-73.
4. Pittendrigh, C.S., *Circadian rhythms and the circadian organization of living systems.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1960. **25**: p. 159-84.
5. Moore, R.Y., *Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus.* Fed Proc, 1983. **42**(11): p. 2783-9.
6. Moore, R.Y. and J.P. Card, *Visual pathways and the entrainment of circadian rhythms.* Ann N Y Acad Sci, 1985. **453**: p. 123-33.
7. Morin, L.P. and C.N. Allen, *The circadian visual system, 2005.* Brain Res Rev, 2006. **51**(1): p. 1-60.
8. Mrosovsky, N., *Masking: history, definitions, and measurement.* Chronobiol Int, 1999. **16**(4): p. 415-29.
9. Aschoff, J., *Circadian Rhythms in Man.* Science, 1965. **148**(3676): p. 1427-32.
10. Pittendrigh, C.S., *The Entrainment of Circadian Oscillations by Skeleton Photoperiods.* Science, 1964. **144**(3618): p. 565.
11. Comas, M. and R.A. Hut, *Twilight and photoperiod affect behavioral entrainment in the house mouse (Mus musculus).* J Biol Rhythms, 2009. **24**(5): p. 403-12.
12. Roenneberg, T., et al., *Entrainment concepts revisited.* J Biol Rhythms, 2010. **25**(5): p. 329-39.
13. Golombek, D.A. and R.E. Rosenstein, *Physiology of circadian entrainment.* Physiol Rev, 2010. **90**(3): p. 1063-102.
14. Challet, E., *Minireview: Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals.* Endocrinology, 2007. **148**(12): p. 5648-55.
15. Hendrickson, A.E., N. Wagoner, and W.M. Cowan, *An autoradiographic and electron microscopic study of retino-hypothalamic connections.* Z Zellforsch Mikrosk Anat, 1972. **135**(1): p. 1-26.
16. Moore, R.Y. and N.J. Lenn, *A retinohypothalamic projection in the rat.* J Comp Neurol, 1972. **146**(1): p. 1-14.
17. Morin, L.P., *Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system.* Exp Neurol, 2013. **243**: p. 4-20.
18. Ebling, F.J., *The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus.* Prog Neurobiol, 1996. **50**(2-3): p. 109-32.
19. Hannibal, J., *Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract.* Cell Tissue Res, 2002. **309**(1): p. 73-88.
20. Chen, D., et al., *Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13468-73.
21. Fahrenkrug, J., *PACAP--a multifacetted neuropeptide.* Chronobiol Int, 2006. **23**(1-2): p. 53-61.
22. Golombek, D.A., et al., *From light to genes: moving the hands of the circadian clock.* Front Biosci, 2003. **8**: p. s285-93.
23. Hannibal, J., *Roles of PACAP-containing retinal ganglion cells in circadian timing.* Int Rev Cytol, 2006. **251**: p. 1-39.
24. Harrington, M.E., *The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: interrelated structures in the visual and circadian systems.* Neurosci Biobehav Rev, 1997. **21**(5): p. 705-27.

25. Albers, H.E., et al., *The dynamics of GABA signaling: Revelations from the circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus.* Front Neuroendocrinol, 2017. **44**: p. 35-82.
26. Morin, L.P., *Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity.* Ann Med, 1999. **31**(1): p. 12-33.
27. Jacobs, E.H., A. Yamatodani, and H. Timmerman, *Is histamine the final neurotransmitter in the entrainment of circadian rhythms in mammals?* Trends Pharmacol Sci, 2000. **21**(8): p. 293-8.
28. Buchanan, G.F. and M.U. Gillette, *New light on an old paradox: site-dependent effects of carbachol on circadian rhythms.* Exp Neurol, 2005. **193**(2): p. 489-96.
29. Colwell, C.S., C.M. Kaufman, and M. Menaker, *Phase-shifting mechanisms in the mammalian circadian system: new light on the carbachol paradox.* J Neurosci, 1993. **13**(4): p. 1454-9.
30. Zatz, M. and M.A. Herkenham, *Intraventricular carbachol mimics the phase-shifting effect of light on the circadian rhythm of wheel-running activity.* Brain Res, 1981. **212**(1): p. 234-8.
31. Cagampang, F.R., et al., *Circadian variation of EAAC1 glutamate transporter messenger RNA in the rat suprachiasmatic nuclei.* Brain Res Mol Brain Res, 1996. **35**(1-2): p. 190-6.
32. Chambille, I., *Circadian rhythm of AMPA receptor GluR2/3 subunit-immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei of Syrian hamster and effect of a light-dark cycle.* Brain Res, 1999. **833**(1): p. 27-38.
33. de Vries, M.J., et al., *Glutamate immunoreactivity in terminals of the retinohypothalamic tract of the brown Norwegian rat.* Brain Res, 1993. **612**(1-2): p. 231-7.
34. Golombek, D.A. and M.R. Ralph, *Let there be light: signal transduction in a mammalian circadian system.* Braz J Med Biol Res, 1996. **29**(1): p. 131-40.
35. Meijer, J.H., et al., *The effects of glutamate on membrane potential and discharge rate of suprachiasmatic neurons.* Brain Res, 1993. **603**(2): p. 284-8.
36. Meijer, J.H., E.A. van der Zee, and M. Dietz, *Glutamate phase shifts circadian activity rhythms in hamsters.* Neurosci Lett, 1988. **86**(2): p. 177-83.
37. Mikkelsen, J.D., P.J. Larsen, and F.J. Ebling, *Distribution of N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor mRNAs in the rat suprachiasmatic nucleus.* Brain Res, 1993. **632**(1-2): p. 329-33.
38. Paul, K.N., et al., *AMPA/kainate receptor antagonist DNQX blocks the acute increase of Per2 mRNA levels in most but not all areas of the SCN.* Brain Res Mol Brain Res, 2005. **139**(1): p. 129-36.
39. Peytevin, J., J. Aioun, and I. Chambille, *Neurons that express the AMPA receptor GluR2/3 subunits in suprachiasmatic nuclei of Syrian hamsters colocalize either vasoactive intestinal peptide, peptide histidine isoleucine or gastrin-releasing peptide.* Cell Tissue Res, 2000. **300**(2): p. 345-59.
40. Kafka, M.S., P.J. Marangos, and R.Y. Moore, *Suprachiasmatic nucleus ablation abolishes circadian rhythms in rat brain neurotransmitter receptors.* Brain Res, 1985. **327**(1-2): p. 344-7.
41. Schwartz, W.J. and P. Zimmerman, *Lesions of the suprachiasmatic nucleus disrupt circadian locomotor rhythms in the mouse.* Physiol Behav, 1991. **49**(6): p. 1283-7.
42. Kalsbeek, A., et al., *The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels.* Endocrinology, 2001. **142**(6): p. 2677-85.
43. Ruby, N.F., et al., *The suprachiasmatic nucleus is essential for circadian body temperature rhythms in hibernating ground squirrels.* J Neurosci, 2002. **22**(1): p. 357-64.
44. Sollars, P.J., D.P. Kimble, and G.E. Pickard, *Restoration of circadian behavior by anterior hypothalamic heterografts.* J Neurosci, 1995. **15**(3 Pt 2): p. 2109-22.

45. Viswanathan, N. and F.C. Davis, *Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian function in aged hamsters.* Brain Res, 1995. **686**(1): p. 10-6.
46. Hurd, M.W., et al., *Circadian locomotor rhythms in aged hamsters following suprachiasmatic transplant.* Am J Physiol, 1995. **269**(5 Pt 2): p. R958-68.
47. Kriegsfeld, L.J., J. LeSauter, and R. Silver, *Targeted microlesions reveal novel organization of the hamster suprachiasmatic nucleus.* J Neurosci, 2004. **24**(10): p. 2449-57.
48. Moore, R.Y., J.C. Speh, and R.K. Leak, *Suprachiasmatic nucleus organization.* Cell Tissue Res, 2002. **309**(1): p. 89-98.
49. van den Pol, A.N. and K.L. Tsujimoto, *Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens.* Neuroscience, 1985. **15**(4): p. 1049-86.
50. Moore, R.Y. and R. Silver, *Suprachiasmatic nucleus organization.* Chronobiol Int, 1998. **15**(5): p. 475-87.
51. Inouye, S.T. and S. Shibata, *Neurochemical organization of circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus.* Neurosci Res, 1994. **20**(2): p. 109-30.
52. Park, H.T., et al., *Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive (CGRPI) elements in the circadian system of the mouse: an immunohistochemistry combined with retrograde transport study.* Brain Res, 1993. **629**(2): p. 335-41.
53. LeSauter, J., et al., *Calbindin expression in the hamster SCN is influenced by circadian genotype and by photic conditions.* Neuroreport, 1999. **10**(15): p. 3159-63.
54. Hastings, M.H. and E.D. Herzog, *Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei.* J Biol Rhythms, 2004. **19**(5): p. 400-13.
55. Moore, R.Y., *Calretinin Neurons in the Rat Suprachiasmatic Nucleus.* J Biol Rhythms, 2016. **31**(4): p. 406-10.
56. Hastings, M.H., M. Brancaccio, and E.S. Maywood, *Circadian pacemaking in cells and circuits of the suprachiasmatic nucleus.* J Neuroendocrinol, 2014. **26**(1): p. 2-10.
57. Yan, L., et al., *Exploring spatiotemporal organization of SCN circuits.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2007. **72**: p. 527-41.
58. Antle, M.C. and R. Silver, *Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock.* Trends Neurosci, 2005. **28**(3): p. 145-51.
59. Meijer, J.H. and W.J. Schwartz, *In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus.* J Biol Rhythms, 2003. **18**(3): p. 235-49.
60. Moga, M.M. and R.Y. Moore, *Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat.* J Comp Neurol, 1997. **389**(3): p. 508-34.
61. Meijer, J.H. and S. Michel, *Neurophysiological analysis of the suprachiasmatic nucleus: a challenge at multiple levels.* Methods Enzymol, 2015. **552**: p. 75-102.
62. Rosenwasser, A.M. and F.W. Turek, *Neurobiology of Circadian Rhythm Regulation.* Sleep Med Clin, 2015. **10**(4): p. 403-12.
63. Silver, R., et al., *A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms.* Nature, 1996. **382**(6594): p. 810-3.
64. Lehman, M.N., et al., *Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain.* J Neurosci, 1987. **7**(6): p. 1626-38.
65. Meyer-Bernstein, E.L., et al., *Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters.* Endocrinology, 1999. **140**(1): p. 207-18.
66. van Esseveldt, K.E., M.N. Lehman, and G.J. Boer, *The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited.* Brain Res Brain Res Rev, 2000. **33**(1): p. 34-77.
67. Bedont, J.L. and S. Blackshaw, *Constructing the suprachiasmatic nucleus: a watchmaker's perspective on the central clockworks.* Front Syst Neurosci, 2015. **9**: p. 74.

68. Ramkisoensing, A. and J.H. Meijer, *Synchronization of Biological Clock Neurons by Light and Peripheral Feedback Systems Promotes Circadian Rhythms and Health.* Front Neurol, 2015. **6**: p. 128.
69. Bartness, T.J., C.K. Song, and G.E. Demas, *SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms.* J Biol Rhythms, 2001. **16**(3): p. 196-204.
70. Kalsbeek, A., et al., *Vasopressin-containing neurons of the suprachiasmatic nuclei inhibit corticosterone release.* Brain Res, 1992. **580**(1-2): p. 62-7.
71. Fu, L. and C.C. Lee, *The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 350-61.
72. Emens, J.S. and H.J. Burgess, *Effect of Light and Melatonin and Other Melatonin Receptor Agonists on Human Circadian Physiology.* Sleep Med Clin, 2015. **10**(4): p. 435-53.
73. Benarroch, E.E., *Suprachiasmatic nucleus and melatonin: reciprocal interactions and clinical correlations.* Neurology, 2008. **71**(8): p. 594-8.
74. Dunlap, J.C., *Molecular bases for circadian clocks.* Cell, 1999. **96**(2): p. 271-90.
75. Okamura, H., S. Yamaguchi, and K. Yagita, *Molecular machinery of the circadian clock in mammals.* Cell Tissue Res, 2002. **309**(1): p. 47-56.
76. Gekakis, N., et al., *Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism.* Science, 1998. **280**(5369): p. 1564-9.
77. Ohno, T., Y. Onishi, and N. Ishida, *A novel E4BP4 element drives circadian expression of mPeriod2.* Nucleic Acids Res, 2007. **35**(2): p. 648-55.
78. Hogenesch, J.B., et al., *The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5474-9.
79. Kume, K., et al., *mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop.* Cell, 1999. **98**(2): p. 193-205.
80. Takahashi, J.S., *Molecular components of the circadian clock in mammals.* Diabetes Obes Metab, 2015. **17 Suppl 1**: p. 6-11.
81. Griffin, E.A., Jr., D. Staknis, and C.J. Weitz, *Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock.* Science, 1999. **286**(5440): p. 768-71.
82. Sangoram, A.M., et al., *Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription.* Neuron, 1998. **21**(5): p. 1101-13.
83. Field, M.D., et al., *Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms.* Neuron, 2000. **25**(2): p. 437-47.
84. Sato, T.K., et al., *Feedback repression is required for mammalian circadian clock function.* Nat Genet, 2006. **38**(3): p. 312-9.
85. Etchegaray, J.P., et al., *Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock.* Nature, 2003. **421**(6919): p. 177-82.
86. Ripperger, J.A. and U. Schibler, *Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions.* Nat Genet, 2006. **38**(3): p. 369-74.
87. Doi, M., J. Hirayama, and P. Sassone-Corsi, *Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase.* Cell, 2006. **125**(3): p. 497-508.
88. Katada, S. and P. Sassone-Corsi, *The histone methyltransferase MLL1 permits the oscillation of circadian gene expression.* Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(12): p. 1414-21.
89. DiTacchio, L., et al., *Histone lysine demethylase JARID1a activates CLOCK-BMAL1 and influences the circadian clock.* Science, 2011. **333**(6051): p. 1881-5.
90. Duong, H.A., et al., *A molecular mechanism for circadian clock negative feedback.* Science, 2011. **332**(6036): p. 1436-9.

91. Nakahata, Y., et al., *The NAD+-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control.* Cell, 2008. **134**(2): p. 329-40.
92. Asher, G., et al., *SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation.* Cell, 2008. **134**(2): p. 317-28.
93. Rutter, J., et al., *Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors.* Science, 2001. **293**(5529): p. 510-4.
94. Ralph, M.R. and M. Menaker, *A mutation of the circadian system in golden hamsters.* Science, 1988. **241**(4870): p. 1225-7.
95. Lowrey, P.L., et al., *Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau.* Science, 2000. **288**(5465): p. 483-92.
96. Camacho, F., et al., *Human casein kinase Idelta phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2.* FEBS Lett, 2001. **489**(2-3): p. 159-65.
97. Eide, E.J., et al., *Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(7): p. 2795-807.
98. Shirogane, T., et al., *SCFbeta-TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein.* J Biol Chem, 2005. **280**(29): p. 26863-72.
99. Vanselow, K., et al., *Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS).* Genes Dev, 2006. **20**(19): p. 2660-72.
100. Siepka, S.M., et al., *Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression.* Cell, 2007. **129**(5): p. 1011-23.
101. Godinho, S.I., et al., *The after-hours mutant reveals a role for Fbxl3 in determining mammalian circadian period.* Science, 2007. **316**(5826): p. 897-900.
102. Busino, L., et al., *SCFFbxl3 controls the oscillation of the circadian clock by directing the degradation of cryptochrome proteins.* Science, 2007. **316**(5826): p. 900-4.
103. Lamia, K.A., et al., *AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation.* Science, 2009. **326**(5951): p. 437-40.
104. Harada, Y., et al., *Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta.* J Biol Chem, 2005. **280**(36): p. 31714-21.
105. Kurabayashi, N., et al., *DYRK1A and glycogen synthase kinase 3beta, a dual-kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping.* Mol Cell Biol, 2010. **30**(7): p. 1757-68.
106. Zheng, B., et al., *Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock.* Cell, 2001. **105**(5): p. 683-94.
107. Cermakian, N., et al., *Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the Period1 gene.* EMBO J, 2001. **20**(15): p. 3967-74.
108. Bae, K., et al., *Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock.* Neuron, 2001. **30**(2): p. 525-36.
109. Zheng, B., et al., *The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock.* Nature, 1999. **400**(6740): p. 169-73.
110. Shearman, L.P., et al., *Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(17): p. 6269-75.
111. Ebisawa, T., et al., *Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome.* EMBO Rep, 2001. **2**(4): p. 342-6.
112. Thresher, R.J., et al., *Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses.* Science, 1998. **282**(5393): p. 1490-4.
113. Vitaterna, M.H., et al., *Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(21): p. 12114-9.

114. van der Horst, G.T., et al., *Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms.* Nature, 1999. **398**(6728): p. 627-30.
115. Baggs, J.E., et al., *Network features of the mammalian circadian clock.* PLoS Biol, 2009. **7**(3): p. e52.
116. Daan, S., et al., *Lab mice in the field: unorthodox daily activity and effects of a dysfunctional circadian clock allele.* J Biol Rhythms, 2011. **26**(2): p. 118-29.
117. Koike, N., et al., *Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals.* Science, 2012. **338**(6105): p. 349-54.
118. Preitner, N., et al., *The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator.* Cell, 2002. **110**(2): p. 251-60.
119. Sato, T.K., et al., *A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock.* Neuron, 2004. **43**(4): p. 527-37.
120. Guillaumond, F., et al., *Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors.* J Biol Rhythms, 2005. **20**(5): p. 391-403.
121. Cho, H., et al., *Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB-alpha and REV-ERB-beta.* Nature, 2012. **485**(7396): p. 123-7.
122. Falvey, E., F. Fleury-Olela, and U. Schibler, *The rat hepatic leukemia factor (HLF) gene encodes two transcriptional activators with distinct circadian rhythms, tissue distributions and target preferences.* EMBO J, 1995. **14**(17): p. 4307-17.
123. Lopez-Molina, L., et al., *The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior.* EMBO J, 1997. **16**(22): p. 6762-71.
124. Fonjallaz, P., et al., *The two PAR leucine zipper proteins, TEF and DBP, display similar circadian and tissue-specific expression, but have different target promoter preferences.* EMBO J, 1996. **15**(2): p. 351-62.
125. Mitsui, S., et al., *Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism.* Genes Dev, 2001. **15**(8): p. 995-1006.
126. Ukai-Tadenuma, M., et al., *Delay in feedback repression by cryptochrome 1 is required for circadian clock function.* Cell, 2011. **144**(2): p. 268-81.
127. Liu, A.C., et al., *Redundant function of REV-ERBalpha and beta and non-essential role for Bmal1 cycling in transcriptional regulation of intracellular circadian rhythms.* PLoS Genet, 2008. **4**(2): p. e1000023.
128. Rey, G. and A.B. Reddy, *Connecting cellular metabolism to circadian clocks.* Trends Cell Biol, 2013. **23**(5): p. 234-41.
129. Colwell, C.S., *Circadian modulation of calcium levels in cells in the suprachiasmatic nucleus.* Eur J Neurosci, 2000. **12**(2): p. 571-6.
130. Irwin, R.P. and C.N. Allen, *Calcium response to retinohypothalamic tract synaptic transmission in suprachiasmatic nucleus neurons.* J Neurosci, 2007. **27**(43): p. 11748-57.
131. Ikeda, M., et al., *Circadian dynamics of cytosolic and nuclear Ca2+ in single suprachiasmatic nucleus neurons.* Neuron, 2003. **38**(2): p. 253-63.
132. Lundkvist, G.B., et al., *A calcium flux is required for circadian rhythm generation in mammalian pacemaker neurons.* J Neurosci, 2005. **25**(33): p. 7682-6.
133. Schmutz, I., et al., *A specific role for the REV-ERBalpha-controlled L-Type Voltage-Gated Calcium Channel CaV1.2 in resetting the circadian clock in the late night.* J Biol Rhythms, 2014. **29**(4): p. 288-98.
134. Mercado, C., et al., *Ryanodine-sensitive intracellular Ca2+ channels in rat suprachiasmatic nuclei are required for circadian clock control of behavior.* J Biol Rhythms, 2009. **24**(3): p. 203-10.
135. Takahashi, J.S., *Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock.* Nat Rev Genet, 2017. **18**(3): p. 164-179.

136. Li, B., et al., *Nuclear BK channels regulate gene expression via the control of nuclear calcium signaling.* Nat Neurosci, 2014. **17**(8): p. 1055-63.
137. Kramer, R.H. and E. Molokanova, *Modulation of cyclic-nucleotide-gated channels and regulation of vertebrate phototransduction.* J Exp Biol, 2001. **204**(Pt 17): p. 2921-31.
138. Kim, D.Y., et al., *Voltage-gated calcium channels play crucial roles in the glutamate-induced phase shifts of the rat suprachiasmatic circadian clock.* Eur J Neurosci, 2005. **21**(5): p. 1215-22.
139. Zhang, L., M. Kolaj, and L.P. Renaud, *Suprachiasmatic nucleus communicates with anterior thalamic paraventricular nucleus neurons via rapid glutamatergic and gabaergic neurotransmission: state-dependent response patterns observed in vitro.* Neuroscience, 2006. **141**(4): p. 2059-66.
140. Morin, L.P., *The circadian visual system.* Brain Res Brain Res Rev, 1994. **19**(1): p. 102-27.
141. Beaule, C., et al., *Circadian modulation of gene expression, but not glutamate uptake, in mouse and rat cortical astrocytes.* PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7476.
142. Colwell, C.S. and M. Menaker, *NMDA as well as non-NMDA receptor antagonists can prevent the phase-shifting effects of light on the circadian system of the golden hamster.* J Biol Rhythms, 1992. **7**(2): p. 125-36.
143. Gannon, R.L. and M.A. Rea, *Glutamate receptor immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus.* Brain Res, 1993. **622**(1-2): p. 337-42.
144. Gannon, R.L. and M.A. Rea, *In situ hybridization of antisense mRNA oligonucleotides for AMPA, NMDA and metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat suprachiasmatic nucleus at different phases of the circadian cycle.* Brain Res Mol Brain Res, 1994. **23**(4): p. 338-44.
145. Moriya, T., et al., *Correlative association between N-methyl-D-aspartate receptor-mediated expression of period genes in the suprachiasmatic nucleus and phase shifts in behavior with photic entrainment of clock in hamsters.* Mol Pharmacol, 2000. **58**(6): p. 1554-62.
146. Vindlacheruvu, R.R., et al., *Blockade of Glutamatergic Neurotransmission in the Suprachiasmatic Nucleus Prevents Cellular and Behavioural Responses of the Circadian System to Light.* Eur J Neurosci, 1992. **4**(7): p. 673-679.
147. Guido, M.E., et al., *Differential effects of glutamatergic blockade on circadian and photic regulation of gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus.* Brain Res Mol Brain Res, 1999. **67**(2): p. 247-57.
148. Mintz, E.M., et al., *Activation of NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus produces light-like phase shifts of the circadian clock in vivo.* J Neurosci, 1999. **19**(12): p. 5124-30.
149. Mintz, E.M. and H.E. Albers, *Microinjection of NMDA into the SCN region mimics the phase shifting effect of light in hamsters.* Brain Res, 1997. **758**(1-2): p. 245-9.
150. Agostino, P.V., et al., *Diurnal, circadian and photic regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase II and neuronal nitric oxide synthase in the hamster suprachiasmatic nuclei.* Neurochem Int, 2004. **44**(8): p. 617-25.
151. Fukushima, T., et al., *The involvement of calmodulin and Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II in the circadian rhythms controlled by the suprachiasmatic nucleus.* Neurosci Lett, 1997. **227**(1): p. 45-8.
152. Golombek, D.A. and M.R. Ralph, *Circadian responses to light: the calmodulin connection.* Neurosci Lett, 1995. **192**(2): p. 101-4.
153. Golombek, D.A. and M.R. Ralph, *KN-62, an inhibitor of Ca2+/calmodulin kinase II, attenuates circadian responses to light.* Neuroreport, 1994. **5**(13): p. 1638-40.
154. Shibata, S. and R.Y. Moore, *Calmodulin inhibitors produce phase shifts of circadian rhythms in vivo and in vitro.* J Biol Rhythms, 1994. **9**(1): p. 27-41.

155. Yokota, S., et al., *Involvement of calcium-calmodulin protein kinase but not mitogen-activated protein kinase in light-induced phase delays and Per gene expression in the suprachiasmatic nucleus of the hamster.* J Neurochem, 2001. **77**(2): p. 618-27.
156. Nomura, K., Y. Takeuchi, and K. Fukunaga, *MAP kinase additively activates the mouse Per1 gene promoter with CaM kinase II.* Brain Res, 2006. **1118**(1): p. 25-33.
157. Nomura, K., et al., *Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the induction of mPer1.* J Neurosci Res, 2003. **72**(3): p. 384-92.
158. Ding, J.M., et al., *Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO.* Science, 1994. **266**(5191): p. 1713-7.
159. Melo, L., D.A. Golombek, and M.R. Ralph, *Regulation of circadian photic responses by nitric oxide.* J Biol Rhythms, 1997. **12**(4): p. 319-26.
160. Watanabe, A., et al., *Effect of a nitric oxide synthase inhibitor, N-nitro-L-arginine methylester, on light-induced phase delay of circadian rhythm of wheel-running activity in golden hamsters.* Neurosci Lett, 1995. **192**(1): p. 25-8.
161. Weber, E.T., et al., *Nitric oxide synthase inhibitor blocks light-induced phase shifts of the circadian activity rhythm, but not c-fos expression in the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster.* Brain Res, 1995. **692**(1-2): p. 137-42.
162. Kriegsfeld, L.J., et al., *Circadian locomotor analysis of male mice lacking the gene for neuronal nitric oxide synthase (nNOS-/-).* J Biol Rhythms, 1999. **14**(1): p. 20-7.
163. Kriegsfeld, L.J., D.L. Drazen, and R.J. Nelson, *Circadian organization in male mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase (eNOS-/-).* J Biol Rhythms, 2001. **16**(2): p. 142-8.
164. Ding, J.M., et al., *A neuronal ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock.* Nature, 1998. **394**(6691): p. 381-4.
165. Diaz-Munoz, M., et al., *Circadian modulation of the ryanodine receptor type 2 in the SCN of rodents.* Neuroreport, 1999. **10**(3): p. 481-6.
166. Pfeffer, M., et al., *The mammalian molecular clockwork controls rhythmic expression of its own input pathway components.* J Neurosci, 2009. **29**(19): p. 6114-23.
167. Stoyanovsky, D., et al., *Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors.* Cell Calcium, 1997. **21**(1): p. 19-29.
168. Kakizawa, S., et al., *Nitric oxide-induced calcium release via ryanodine receptors regulates neuronal function.* EMBO J, 2012. **31**(2): p. 417-28.
169. Ferreyra, G.A. and D.A. Golombek, *Rhythmicity of the cGMP-related signal transduction pathway in the mammalian circadian system.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. **280**(5): p. R1348-55.
170. Oster, H., et al., *cGMP-dependent protein kinase II modulates mPer1 and mPer2 gene induction and influences phase shifts of the circadian clock.* Curr Biol, 2003. **13**(9): p. 725-33.
171. Tischkau, S.A., et al., *Protein kinase G type II is required for night-to-day progression of the mammalian circadian clock.* Neuron, 2004. **43**(4): p. 539-49.
172. Golombek, D.A., et al., *Signaling in the mammalian circadian clock: the NO/cGMP pathway.* Neurochem Int, 2004. **45**(6): p. 929-36.
173. Mathur, A., D.A. Golombek, and M.R. Ralph, *cGMP-dependent protein kinase inhibitors block light-induced phase advances of circadian rhythms in vivo.* Am J Physiol, 1996. **270**(5 Pt 2): p. R1031-6.
174. Weber, E.T., R.L. Gannon, and M.A. Rea, *cGMP-dependent protein kinase inhibitor blocks light-induced phase advances of circadian rhythms in vivo.* Neurosci Lett, 1995. **197**(3): p. 227-30.
175. Tischkau, S.A., et al., *Circadian clock-controlled regulation of cGMP-protein kinase G in the nocturnal domain.* J Neurosci, 2003. **23**(20): p. 7543-50.

176. Prosser, R.A., A.J. McArthur, and M.U. Gillette, *cGMP induces phase shifts of a mammalian circadian pacemaker at night, in antiphase to cAMP effects.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(17): p. 6812-5.
177. Plano, S.A., P.V. Agostino, and D.A. Golombek, *Extracellular nitric oxide signaling in the hamster biological clock.* FEBS Lett, 2007. **581**(28): p. 5500-4.
178. Plano, S.A., D.A. Golombek, and J.J. Chiesa, *Circadian entrainment to light-dark cycles involves extracellular nitric oxide communication within the suprachiasmatic nuclei.* Eur J Neurosci, 2010. **31**(5): p. 876-82.
179. Butcher, G.Q., B. Lee, and K. Obrietan, *Temporal regulation of light-induced extracellular signal-regulated kinase activation in the suprachiasmatic nucleus.* J Neurophysiol, 2003. **90**(6): p. 3854-63.
180. Butcher, G.Q., et al., *The p42/44 mitogen-activated protein kinase pathway couples photic input to circadian clock entrainment.* J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 29519-25.
181. Dziema, H., et al., *The ERK/MAP kinase pathway couples light to immediate-early gene expression in the suprachiasmatic nucleus.* Eur J Neurosci, 2003. **17**(8): p. 1617-27.
182. Obrietan, K., S. Impey, and D.R. Storm, *Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei.* Nat Neurosci, 1998. **1**(8): p. 693-700.
183. Pizzio, G.A., et al., *Circadian and photic regulation of ERK, JNK and p38 in the hamster SCN.* Neuroreport, 2003. **14**(11): p. 1417-9.
184. Burgoon, P.W., P.T. Lindberg, and M.U. Gillette, *Different patterns of circadian oscillation in the suprachiasmatic nucleus of hamster, mouse, and rat.* J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, 2004. **190**(2): p. 167-71.
185. Ding, J.M., et al., *Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide.* J Neurosci, 1997. **17**(2): p. 667-75.
186. Gau, D., et al., *Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock.* Neuron, 2002. **34**(2): p. 245-53.
187. Ginty, D.D., et al., *Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock.* Science, 1993. **260**(5105): p. 238-41.
188. Obrietan, K., et al., *Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei.* J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17748-56.
189. Schurov, I.L., et al., *Glutamatergic induction of CREB phosphorylation and Fos expression in primary cultures of the suprachiasmatic hypothalamus in vitro is mediated by co-ordinate activity of NMDA and non-NMDA receptors.* J Neuroendocrinol, 1999. **11**(1): p. 43-51.
190. von Gall, C., et al., *CREB in the mouse SCN: a molecular interface coding the phase-adjusting stimuli light, glutamate, PACAP, and melatonin for clockwork access.* J Neurosci, 1998. **18**(24): p. 10389-97.
191. Sakamoto, K., et al., *Clock and light regulation of the CREB coactivator CRTC1 in the suprachiasmatic circadian clock.* J Neurosci, 2013. **33**(21): p. 9021-7.
192. Lee, B., et al., *CREB influences timing and entrainment of the SCN circadian clock.* J Biol Rhythms, 2010. **25**(6): p. 410-20.
193. Lamas, M., et al., *CREM: a master-switch in the transcriptional response to cAMP.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1996. **351**(1339): p. 561-7.
194. Stehle, J.H., et al., *Light-induced expression of transcription factor ICER (inducible cAMP early repressor) in rat suprachiasmatic nucleus is phase-restricted.* Neurosci Lett, 1996. **217**(2-3): p. 169-72.
195. Foulkes, N.S., et al., *Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis.* Trends Neurosci, 1997. **20**(10): p. 487-92.
196. Foulkes, N.S., G. Duval, and P. Sassone-Corsi, *Adaptive inducibility of CREM as transcriptional memory of circadian rhythms.* Nature, 1996. **381**(6577): p. 83-5.

197. Edery, I., J.E. Rutila, and M. Rosbash, *Phase shifting of the circadian clock by induction of the Drosophila period protein.* Science, 1994. **263**(5144): p. 237-40.
198. Albrecht, U., et al., *A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light.* Cell, 1997. **91**(7): p. 1055-64.
199. Shearman, L.P., et al., *Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei.* Neuron, 1997. **19**(6): p. 1261-9.
200. Shigeyoshi, Y., et al., *Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript.* Cell, 1997. **91**(7): p. 1043-53.
201. Yan, L. and R. Silver, *Resetting the brain clock: time course and localization of mPER1 and mPER2 protein expression in suprachiasmatic nuclei during phase shifts.* Eur J Neurosci, 2004. **19**(4): p. 1105-9.
202. Travnickova-Bendova, Z., et al., *Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7728-33.
203. Harbour, V.L., et al., *Phase differences in expression of circadian clock genes in the central nucleus of the amygdala, dentate gyrus, and suprachiasmatic nucleus in the rat.* PLoS One, 2014. **9**(7): p. e103309.
204. Foyer, C.H. and G. Noctor, *Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub.* Plant Physiol, 2011. **155**(1): p. 2-18.
205. Hempel, N. and M. Trebak, *Crosstalk between calcium and reactive oxygen species signaling in cancer.* Cell Calcium, 2017.
206. Perez, S., et al., *Redox signaling in the gastrointestinal tract.* Free Radic Biol Med, 2017. **104**: p. 75-103.
207. Liu, Y. and C. He, *A review of redox signaling and the control of MAP kinase pathway in plants.* Redox Biol, 2016. **11**: p. 192-204.
208. Pires, P.W. and S. Earley, *Redox Regulation of Transient Receptor Potential Channels in the Endothelium.* Microcirculation, 2016.
209. Sies, H., *Role of metabolic H2O2 generation: redox signaling and oxidative stress.* J Biol Chem, 2014. **289**(13): p. 8735-41.
210. Redza-Dutordoir, M. and D.A. Averill-Bates, *Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species.* Biochim Biophys Acta, 2016. **1863**(12): p. 2977-2992.
211. Newsholme, P., et al., *Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes.* Biochem J, 2016. **473**(24): p. 4527-4550.
212. Chandrasekaran, A., M.D. Idelchik, and J.A. Melendez, *Redox control of senescence and age-related disease.* Redox Biol, 2016. **11**: p. 91-102.
213. Sohal, R.S. and W.C. Orr, *The redox stress hypothesis of aging.* Free Radic Biol Med, 2012. **52**(3): p. 539-55.
214. Pani, G., et al., *Cell compartmentalization in redox signaling.* IUBMB Life, 2001. **52**(1-2): p. 7-16.
215. Go, Y.M. and D.P. Jones, *Redox compartmentalization in eukaryotic cells.* Biochim Biophys Acta, 2008. **1780**(11): p. 1273-90.
216. Doi, R., K. Oishi, and N. Ishida, *CLOCK regulates circadian rhythms of hepatic glycogen synthesis through transcriptional activation of Gys2.* J Biol Chem, 2010. **285**(29): p. 22114-21.
217. Kaludercic, N., S. Deshwal, and F. Di Lisa, *Reactive oxygen species and redox compartmentalization.* Front Physiol, 2014. **5**: p. 285.
218. Gupta, N. and S.W. Ragsdale, *Thiol-disulfide redox dependence of heme binding and heme ligand switching in nuclear hormone receptor rev-erb{beta}.* J Biol Chem, 2011. **286**(6): p. 4392-403.
219. Go, Y.M. and D.P. Jones, *Cysteine/cystine redox signaling in cardiovascular disease.* Free Radic Biol Med, 2011. **50**(4): p. 495-509.

220. Blanco, R.A., et al., *Diurnal variation in glutathione and cysteine redox states in human plasma.* Am J Clin Nutr, 2007. **86**(4): p. 1016-23.
221. Wang, T.A., et al., *Circadian rhythm of redox state regulates excitability in suprachiasmatic nucleus neurons.* Science, 2012. **337**(6096): p. 839-42.
222. Gyongyosi, N. and K. Kaldi, *Interconnections of reactive oxygen species homeostasis and circadian rhythm in Neurospora crassa.* Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(18): p. 3007-23.
223. Gillette, M.U. and T.A. Wang, *Brain circadian oscillators and redox regulation in mammals.* Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(18): p. 2955-65.
224. Klichko, V.I., et al., *Aging alters circadian regulation of redox in Drosophila.* Front Genet, 2015. **6**: p. 83.
225. Carter, E.L. and S.W. Ragsdale, *Modulation of nuclear receptor function by cellular redox poise.* J Inorg Biochem, 2014. **133**: p. 92-103.
226. Rey, G. and A.B. Reddy, *Interplay between cellular redox oscillations and circadian clocks.* Diabetes Obes Metab, 2015. **17 Suppl 1**: p. 55-64.
227. O'Neill, J.S. and A.B. Reddy, *Circadian clocks in human red blood cells.* Nature, 2011. **469**(7331): p. 498-503.
228. O'Neill, J.S., et al., *Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote.* Nature, 2011. **469**(7331): p. 554-8.
229. Inupakutika, M.A., et al., *The evolution of reactive oxygen species metabolism.* J Exp Bot, 2016. **67**(21): p. 5933-5943.
230. Edgar, R.S., et al., *Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms.* Nature, 2012. **485**(7399): p. 459-64.
231. Loudon, A.S., *Circadian biology: a 2.5 billion year old clock.* Curr Biol, 2012. **22**(14): p. R570-1.
232. Hastings, M.H., E.S. Maywood, and J.S. O'Neill, *Cellular circadian pacemaking and the role of cytosolic rhythms.* Curr Biol, 2008. **18**(17): p. R805-R815.
233. Ramsey, K.M., et al., *Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD+ biosynthesis.* Science, 2009. **324**(5927): p. 651-4.
234. Nakahata, Y., et al., *Circadian control of the NAD+ salvage pathway by CLOCK-SIRT1.* Science, 2009. **324**(5927): p. 654-7.
235. Yin, L., et al., *Rev-erbalpha, a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways.* Science, 2007. **318**(5857): p. 1786-9.
236. Girvan, H.M. and A.W. Munro, *Heme sensor proteins.* J Biol Chem, 2013. **288**(19): p. 13194-203.
237. Reinking, J., et al., *The Drosophila nuclear receptor e75 contains heme and is gas responsive.* Cell, 2005. **122**(2): p. 195-207.
238. Kaasik, K. and C.C. Lee, *Reciprocal regulation of haem biosynthesis and the circadian clock in mammals.* Nature, 2004. **430**(6998): p. 467-71.
239. Estall, J.L., et al., *PGC-1alpha negatively regulates hepatic FGF21 expression by modulating the heme/Rev-Erb(alpha) axis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(52): p. 22510-5.
240. Taylor, B.L. and I.B. Zhulin, *PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light.* Microbiol Mol Biol Rev, 1999. **63**(2): p. 479-506.
241. Huang, N., et al., *Crystal structure of the heterodimeric CLOCK:BMAL1 transcriptional activator complex.* Science, 2012. **337**(6091): p. 189-94.
242. Hennig, S., et al., *Structural and functional analyses of PAS domain interactions of the clock proteins Drosophila PERIOD and mouse PERIOD2.* PLoS Biol, 2009. **7**(4): p. e94.
243. Crane, B.R. and M.W. Young, *Interactive features of proteins composing eukaryotic circadian clocks.* Annu Rev Biochem, 2014. **83**: p. 191-219.

244. Artinian, L.R., J.M. Ding, and M.U. Gillette, *Carbon monoxide and nitric oxide: interacting messengers in muscarinic signaling to the brain's circadian clock.* Exp Neurol, 2001. **171**(2): p. 293-300.
245. Dioum, E.M., et al., *NPAS2: a gas-responsive transcription factor.* Science, 2002. **298**(5602): p. 2385-7.
246. Lukat-Rodgers, G.S., et al., *Heme-based sensing by the mammalian circadian protein CLOCK.* Inorg Chem, 2010. **49**(14): p. 6349-65.
247. Schmalen, I., et al., *Interaction of circadian clock proteins CRY1 and PER2 is modulated by zinc binding and disulfide bond formation.* Cell, 2014. **157**(5): p. 1203-15.
248. Nangle, S.N., et al., *Molecular assembly of the period-cryptochrome circadian transcriptional repressor complex.* Elife, 2014. **3**: p. e03674.
249. Hirayama, J., S. Cho, and P. Sassone-Corsi, *Circadian control by the reduction/oxidation pathway: catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(40): p. 15747-52.
250. Grover, D., et al., *Hydrogen peroxide stimulates activity and alters behavior in Drosophila melanogaster.* PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7580.
251. Yoshida, Y., et al., *Cross-talk between the cellular redox state and the circadian system in Neurospora.* PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28227.
252. Lu, Y., et al., *Regulation of the cyanobacterial circadian clock by electrochemically controlled extracellular electron transfer.* Angew Chem Int Ed Engl, 2014. **53**(8): p. 2208-11.
253. Kirsch, M. and H. de Groot, *N-nitrosomelatonin: synthesis, chemical properties, potential prodrug.* J Pineal Res, 2009. **46**(2): p. 121-7.
254. Turjanski, A., et al., *Scavenging of NO by Melatonin.* J. Am. Chem. Soc., 2000. **122**: p. 10468-10469.
255. Berchner-Pfannschmidt, U., et al., *The impact of N-nitrosomelatonin as nitric oxide donor in cell culture experiments.* J Pineal Res, 2008. **45**(4): p. 489-96.
256. Peyrot, F., et al., *Pharmacokinetics of 1-nitrosomelatonin and detection by EPR using iron dithiocarbamate complex in mice.* Biochem J, 2005. **387**(Pt 2): p. 473-8.
257. Blanchard-Fillion, B., C. Servy, and C. Ducrocq, *1-Nitrosomelatonin is a spontaneous NO-releasing compound.* Free Radic Res, 2001. **35**(6): p. 857-66.
258. De Biase, P.M., et al., *Mechanisms of NO release by N1-nitrosomelatonin: nucleophilic attack versus reducing pathways.* J Org Chem, 2005. **70**(15): p. 5790-8.
259. Dunlap, J.C., J.J. Loros, and P.J. DeCoursey, *Chronobiology. Biological Timekeeping.* 2004.
260. Rosenberg, R.S., P.C. Zee, and F.W. Turek, *Phase response curves to light in young and old hamsters.* Am J Physiol, 1991. **261**(2 Pt 2): p. R491-5.
261. Smith, R.D., F.W. Turek, and J.S. Takahashi, *Two families of phase-response curves characterize the resetting of the hamster circadian clock.* Am J Physiol, 1992. **262**(6 Pt 2): p. R1149-53.
262. Aschoff, J., *Response curve in circadian periodicity*, in *Circadian Clocks*, J. Aschoff, Editor. 1965: North-Holland, Amsterdam. p. 95-11.
263. Marpegan, L., et al., *Circadian responses to endotoxin treatment in mice.* J Neuroimmunol, 2005. **160**(1-2): p. 102-9.
264. Kornhauser, J.M., K.E. Mayo, and J.S. Takahashi, *Light, immediate-early genes, and circadian rhythms.* Behav Genet, 1996. **26**(3): p. 221-40.
265. Porterfield, V.M. and E.M. Mintz, *Temporal patterns of light-induced immediate-early gene expression in the suprachiasmatic nucleus.* Neurosci Lett, 2009. **463**(1): p. 70-3.
266. Travnickova, Z., et al., *Photoperiod-dependent correlation between light-induced SCN c-fos expression and resetting of circadian phase.* Am J Physiol, 1996. **271**(4 Pt 2): p. R825-31.

267. Salter, M., et al., *Ex vivo measurement of brain tissue nitrite and nitrate accurately reflects nitric oxide synthase activity in vivo.* J Neurochem, 1996. **66**(4): p. 1683-90.
268. Mistlberger, R.E., *Nonphotic entrainment of circadian activity rhythms in suprachiasmatic nuclei-ablated hamsters.* Behav Neurosci, 1992. **106**(1): p. 192-202.
269. Yannielli, P. and M.E. Harrington, *Let there be "more" light: enhancement of light actions on the circadian system through non-photic pathways.* Prog Neurobiol, 2004. **74**(1): p. 59-76.
270. Hart, J.D. and A.F. Dulhunty, *Nitric oxide activates or inhibits skeletal muscle ryanodine receptors depending on its concentration, membrane potential and ligand binding.* J Membr Biol, 2000. **173**(3): p. 227-36.
271. Wang, H., et al., *Regulation of myocyte contraction via neuronal nitric oxide synthase: role of ryanodine receptor S-nitrosylation.* J Physiol, 2010. **588**(Pt 15): p. 2905-17.
272. Kirsch, M. and H. de Groot, *N-nitrosomelatonin outcompetes S-nitrosocysteine in inhibiting glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: first evidence that N-nitrosomelatonin can modify protein function.* J Pineal Res, 2008. **44**(3): p. 244-9.
273. Russwurm, M. and D. Koesling, *NO activation of guanylyl cyclase.* EMBO J, 2004. **23**(22): p. 4443-50.
274. Rodriguez-Juarez, F., E. Aguirre, and S. Cadenas, *Relative sensitivity of soluble guanylate cyclase and mitochondrial respiration to endogenous nitric oxide at physiological oxygen concentration.* Biochem J, 2007. **405**(2): p. 223-31.
275. Hall, C.N. and J. Garthwaite, *What is the real physiological NO concentration in vivo?* Nitric Oxide, 2009. **21**(2): p. 92-103.
276. Evangelista, A.M., M.J. Kohr, and E. Murphy, *S-Nitrosylation: Specificity, Occupancy, and Interaction with Other Post-Translational Modifications.* Antioxid Redox Signal, 2013.
277. Martinez-Ruiz, A., et al., *Specificity in S-Nitrosylation: A Short-Range Mechanism for NO Signaling?* Antioxid Redox Signal, 2013.
278. Oliveira, C.J., et al., *The low molecular weight S-nitrosothiol, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, promotes cell cycle progression in rabbit aortic endothelial cells.* Nitric Oxide, 2008. **18**(4): p. 241-55.
279. Matsumoto, A. and A.J. Gow, *Membrane transfer of S-nitrosothiols.* Nitric Oxide, 2011. **25**(2): p. 102-7.
280. Nakamura, T. and S.A. Lipton, *Emerging role of protein-protein transnitrosylation in cell signaling pathways.* Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(3): p. 239-49.
281. Sengupta, R. and A. Holmgren, *Thioredoxin and thioredoxin reductase in relation to reversible s-nitrosylation.* Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(3): p. 259-69.
282. Turjanski, A., et al., *N-nitrosomelatonin.* Acta Crystallogr C, 2000. **56 (Pt 6)**: p. 682-3.
283. Caspi, O., *Melatonin for the prevention and treatment of jet lag.* Altern Ther Health Med, 2004. **10**(2): p. 74-8.
284. Herxheimer, A. and K.J. Petrie, *Melatonin for the prevention and treatment of jet lag.* Cochrane Database Syst Rev, 2002(2): p. CD001520.
285. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.* Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
286. Jayakumari, N.R., et al., *Are nitric oxide-mediated protein modifications of functional significance in diabetic heart? ye'S, -NO', wh'Y-NO't?* Nitric Oxide, 2014. **43**: p. 35-44.
287. Cho, H.J., et al., *Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages.* J Exp Med, 1992. **176**(2): p. 599-604.
288. Hemmens, B. and B. Mayer, *Enzymology of nitric oxide synthases.* Methods Mol Biol, 1998. **100**: p. 1-32.
289. Hemmens, B., et al., *Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase.* J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 35786-91.

290. Li, H., et al., *Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase.* J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 21276-84.
291. Campbell, M.G., et al., *Molecular architecture of mammalian nitric oxide synthases.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(35): p. E3614-23.
292. Rosenfeld, R.J., et al., *Nitric-oxide synthase forms N-NO-pterin and S-NO-cys: implications for activity, allostery, and regulation.* J Biol Chem, 2010. **285**(41): p. 31581-9.
293. Crane, B.R., et al., *Structures of the N(omega)-hydroxy-L-arginine complex of inducible nitric oxide synthase oxygenase dimer with active and inactive pterins.* Biochemistry, 2000. **39**(16): p. 4608-21.
294. Smith, B.C., N.B. Fernhoff, and M.A. Marletta, *Mechanism and kinetics of inducible nitric oxide synthase auto-S-nitrosation and inactivation.* Biochemistry, 2012. **51**(5): p. 1028-40.
295. Smith, B.C. and M.A. Marletta, *Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitric oxide signaling.* Curr Opin Chem Biol, 2012. **16**(5-6): p. 498-506.
296. Martinez-Ruiz, A., S. Cadenas, and S. Lamas, *Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms.* Free Radic Biol Med, 2011. **51**(1): p. 17-29.
297. Lamotte, O., et al., *Protein S-nitrosylation: specificity and identification strategies in plants.* Front Chem, 2014. **2**: p. 114.
298. Yap, L.P., et al., *Determination of GSH, GSSG, and GSNO using HPLC with electrochemical detection.* Methods Enzymol, 2010. **473**: p. 137-47.
299. Kluge, I., et al., *S-nitrosoglutathione in rat cerebellum: identification and quantification by liquid chromatography-mass spectrometry.* J Neurochem, 1997. **69**(6): p. 2599-607.
300. Ganzarolli de Oliveira, M., *S-Nitrosothiols as Platforms for Topical Nitric Oxide Delivery.* Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2016. **119 Suppl 3**: p. 49-56.
301. Feil, R. and T. Kleppisch, *NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission.* Handb Exp Pharmacol, 2008(184): p. 529-60.
302. Hardingham, N., J. Dachtler, and K. Fox, *The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis.* Front Cell Neurosci, 2013. **7**: p. 190.
303. Boehning, D. and S.H. Snyder, *Novel neural modulators.* Annu Rev Neurosci, 2003. **26**: p. 105-31.
304. Doucet, M.V., A. Harkin, and K.K. Dev, *The PSD-95/nNOS complex: new drugs for depression?* Pharmacol Ther, 2012. **133**(2): p. 218-29.
305. Fang, M., et al., *Dexras1: a G protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON.* Neuron, 2000. **28**(1): p. 183-93.
306. Eliasson, M.J., et al., *Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3396-401.
307. Choi, Y.B., et al., *Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation.* Nat Neurosci, 2000. **3**(1): p. 15-21.
308. Jaffrey, S.R., et al., *CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95.* Neuron, 1998. **20**(1): p. 115-24.
309. Wang, J., et al., *Research progress in NOS1AP in neurological and psychiatric diseases.* Brain Res Bull, 2016. **125**: p. 99-105.
310. Irvine, J.C., et al., *Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story.* Trends Pharmacol Sci, 2008. **29**(12): p. 601-8.
311. Fukuto, J.M., et al., *Nitroxyl (HNO): chemistry, biochemistry, and pharmacology.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 335-55.
312. Switzer, C.H., et al., *The emergence of nitroxyl (HNO) as a pharmacological agent.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(7): p. 835-40.

313. Singh, A., et al., *Agents with vasodilator properties in acute heart failure.* Eur Heart J, 2016.
314. Fukuto, J.M. and S.J. Carrington, *HNO signaling mechanisms.* Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(9): p. 1649-57.
315. Paolocci, N., et al., *Positive inotropic and lusitropic effects of HNO/NO- in failing hearts: independence from beta-adrenergic signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5537-42.
316. Eberhardt, M., et al., *H2S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 4381.
317. Karsan, N. and P.J. Goadsby, *CGRP mechanism antagonists and migraine management.* Curr Neurol Neurosci Rep, 2015. **15**(5): p. 25.
318. Negro, A., et al., *CGRP receptor antagonists: an expanding drug class for acute migraine?* Expert Opin Investig Drugs, 2012. **21**(6): p. 807-18.
319. Broniowska, K.A., A.R. Diers, and N. Hogg, *S-nitrosoglutathione.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(5): p. 3173-81.
320. DuMond, J.F. and S.B. King, *The chemistry of nitroxyl-releasing compounds.* Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(9): p. 1637-48.
321. Tocchetti, C.G., et al., *Nitroxyl improves cellular heart function by directly enhancing cardiac sarcoplasmic reticulum Ca2+ cycling.* Circ Res, 2007. **100**(1): p. 96-104.
322. Cheong, E., et al., *Nitroxyl triggers Ca2+ release from skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum by oxidizing ryanodine receptors.* Cell Calcium, 2005. **37**(1): p. 87-96.
323. Zeller, A., et al., *Mechanisms underlying activation of soluble guanylate cyclase by the nitroxyl donor Angeli's salt.* Mol Pharmacol, 2009. **76**(5): p. 1115-22.
324. Kerksick, C. and D. Willoughby, *The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress.* J Int Soc Sports Nutr, 2005. **2**: p. 38-44.
325. Sadowska, A.M., et al., *Role of N-acetylcysteine in the management of COPD.* Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2006. **1**(4): p. 425-34.
326. Fowdar, K., et al., *The effect of N-acetylcysteine on exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: A meta-analysis and systematic review.* Heart Lung, 2017.
327. Green, J.L., et al., *Oral and Intravenous Acetylcysteine for Treatment of Acetaminophen Toxicity: A Systematic Review and Meta-analysis.* West J Emerg Med, 2013. **14**(3): p. 218-26.
328. Uraz, S., et al., *N-acetylcysteine expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic acid-induced colitis in rats.* Scand J Clin Lab Invest, 2013. **73**(1): p. 61-6.
329. Miranda, K.M., et al., *Mechanism of aerobic decomposition of Angeli's salt (sodium trioxodinitrate) at physiological pH.* J Am Chem Soc, 2005. **127**(2): p. 722-31.
330. Breitbart, R., et al., *Intraperitoneal N-acetylcysteine for acute iron intoxication in rats.* Drug Chem Toxicol, 2011. **34**(4): p. 429-32.
331. Victor, V.M., M. Rocha, and M. De la Fuente, *Regulation of macrophage function by the antioxidant N-acetylcysteine in mouse-oxidative stress by endotoxin.* Int Immunopharmacol, 2003. **3**(1): p. 97-106.
332. Santos, P., et al., *Anxiolytic properties of N-acetylcysteine in mice.* Behav Brain Res, 2017. **317**: p. 461-469.
333. Cooper, A.J. and B.S. Kristal, *Multiple roles of glutathione in the central nervous system.* Biol Chem, 1997. **378**(8): p. 793-802.
334. Dringen, R., *Metabolism and functions of glutathione in brain.* Prog Neurobiol, 2000. **62**(6): p. 649-71.
335. Suarez, S.A., et al., *Time-resolved electrochemical quantification of azanone (HNO) at low nanomolar level.* Anal Chem, 2013. **85**(21): p. 10262-9.

336. Rushworth, G.F. and I.L. Megson, *Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits.* Pharmacol Ther, 2014. **141**(2): p. 150-9.
337. Sunitha, K., et al., *N-Acetylcysteine amide: a derivative to fulfill the promises of N-Acetylcysteine.* Free Radic Res, 2013. **47**(5): p. 357-67.
338. Bavarsad Shahripour, R., M.R. Harrigan, and A.V. Alexandrov, *N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities.* Brain Behav, 2014. **4**(2): p. 108-22.
339. Madej, E., et al., *Thiyl radicals react with nitric oxide to form S-nitrosothiols with rate constants near the diffusion-controlled limit.* Free Radic Biol Med, 2008. **44**(12): p. 2013-8.
340. Berk, M., et al., *The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry.* Trends Pharmacol Sci, 2013. **34**(3): p. 167-77.
341. Holdiness, M.R., *Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine.* Clin Pharmacokinet, 1991. **20**(2): p. 123-34.
342. Sayed, N., et al., *Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(30): p. 12312-7.
343. Fioramonti, X., et al., *Hypothalamic S-nitrosylation contributes to the counter-regulatory response impairment following recurrent hypoglycemia.* PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68709.
344. Scharfstein, J.S., et al., *In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols.* J Clin Invest, 1994. **94**(4): p. 1432-9.
345. Gonzalez, D.R., et al., *Deficient ryanodine receptor S-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium leak and arrhythmogenesis in cardiomyocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(51): p. 20612-7.
346. Fernhoff, N.B., E.R. Derbyshire, and M.A. Marletta, *A nitric oxide/cysteine interaction mediates the activation of soluble guanylate cyclase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(51): p. 21602-7.
347. Elbini Dhouib, I., et al., *A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches.* Life Sci, 2016. **151**: p. 359-63.
348. Zhou, J., et al., *Intravenous Administration of Stable-Labeled N-Acetylcysteine Demonstrates an Indirect Mechanism for Boosting Glutathione and Improving Redox Status.* J Pharm Sci, 2015. **104**(8): p. 2619-26.
349. Reyes, R.C., et al., *Neuronal Glutathione Content and Antioxidant Capacity can be Normalized In Situ by N-acetyl Cysteine Concentrations Attained in Human Cerebrospinal Fluid.* Neurotherapeutics, 2016. **13**(1): p. 217-25.
350. Whillier, S., et al., *Role of N-acetylcysteine and cystine in glutathione synthesis in human erythrocytes.* Redox Rep, 2009. **14**(3): p. 115-24.
351. Radtke, K.K., et al., *Interaction of N-acetylcysteine and cysteine in human plasma.* J Pharm Sci, 2012. **101**(12): p. 4653-9.
352. Holmay, M.J., et al., *N-Acetylcysteine boosts brain and blood glutathione in Gaucher and Parkinson diseases.* Clin Neuropharmacol, 2013. **36**(4): p. 103-6.
353. Mortola, J.P., *Correlations between the circadian patterns of body temperature, metabolism and breathing in rats.* Respir Physiol Neurobiol, 2007. **155**(2): p. 137-46.
354. Mortola, J.P., *Breathing around the clock: an overview of the circadian pattern of respiration.* Eur J Appl Physiol, 2004. **91**(2-3): p. 119-29.
355. Belanger, M. and P.J. Magistretti, *The role of astroglia in neuroprotection.* Dialogues Clin Neurosci, 2009. **11**(3): p. 281-95.
356. Wang, X.F. and M.S. Cynader, *Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione.* J Neurochem, 2000. **74**(4): p. 1434-42.

357. Stone, J.R. and M.A. Marletta, *Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states.* Biochemistry, 1994. **33**(18): p. 5636-40.
358. Ignarro, L.J., et al., *Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung.* Biochim Biophys Acta, 1982. **718**(1): p. 49-59.
359. Padayatti, P.S., et al., *Structural insights into the regulation and the activation mechanism of mammalian guanylyl cyclases.* Pharmacol Ther, 2004. **104**(2): p. 83-99.
360. Bellamy, T.C., J. Wood, and J. Garthwaite, *On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 507-10.
361. Gonzalez, D.R., et al., *S-Nitrosylation of cardiac ion channels.* J Cardiovasc Pharmacol, 2009. **54**(3): p. 188-95.
362. Fukuto, J.M., et al., *The pharmacological activity of nitroxyl: a potent vasodilator with activity similar to nitric oxide and/or endothelium-derived relaxing factor.* J Pharmacol Exp Ther, 1992. **263**(2): p. 546-51.
363. Bianco, C.L., et al., *The chemical biology of HNO signaling.* Arch Biochem Biophys, 2016.
364. Miller, T.W., et al., *The effects of nitroxyl (HNO) on soluble guanylate cyclase activity: interactions at ferrous heme and cysteine thiols.* J Biol Chem, 2009. **284**(33): p. 21788-96.
365. Bartberger, M.D., J.M. Fukuto, and K.N. Houk, *On the acidity and reactivity of HNO in aqueous solution and biological systems.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2194-8.
366. Miranda, K.M., et al., *A biochemical rationale for the discrete behavior of nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9196-201.
367. Jackson, M.I., et al., *Kinetic feasibility of nitroxyl reduction by physiological reductants and biological implications.* Free Radic Biol Med, 2009. **47**(8): p. 1130-9.
368. Wong, P.S., et al., *Reaction between S-nitrosothiols and thiols: generation of nitroxyl (HNO) and subsequent chemistry.* Biochemistry, 1998. **37**(16): p. 5362-71.
369. Fukuto, J.M., et al., *Examining nitroxyl in biological systems.* Methods Enzymol, 2008. **440**: p. 411-31.
370. Espey, M.G., et al., *Ingress and reactive chemistry of nitroxyl-derived species within human cells.* Free Radic Biol Med, 2002. **33**(6): p. 827-34.
371. Wink, D.A., et al., *Orthogonal properties of the redox siblings nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system: a novel redox paradigm.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(6): p. H2264-76.
372. Donzelli, S., et al., *Discriminating formation of HNO from other reactive nitrogen oxide species.* Free Radic Biol Med, 2006. **40**(6): p. 1056-66.
373. Paolocci, N., et al., *Nitroxyl anion exerts redox-sensitive positive cardiac inotropy in vivo by calcitonin gene-related peptide signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10463-8.
374. Paolocci, N., et al., *The pharmacology of nitroxyl (HNO) and its therapeutic potential: not just the Janus face of NO.* Pharmacol Ther, 2007. **113**(2): p. 442-58.
375. Trasforini, G., et al., *Circadian profile of plasma calcitonin gene-related peptide in healthy man.* J Clin Endocrinol Metab, 1991. **73**(5): p. 945-51.
376. Portaluppi, F., et al., *Circadian rhythm of calcitonin gene-related peptide in uncomplicated essential hypertension.* J Hypertens, 1992. **10**(10): p. 1227-34.
377. Yildiz, O., et al., *Crystal structure and interactions of the PAS repeat region of the Drosophila clock protein PERIOD.* Mol Cell, 2005. **17**(1): p. 69-82.
378. Langmesser, S., et al., *Interaction of circadian clock proteins PER2 and CRY with BMAL1 and CLOCK.* BMC Mol Biol, 2008. **9**: p. 41.

379. Chen, R., et al., *Rhythmic PER abundance defines a critical nodal point for negative feedback within the circadian clock mechanism.* Mol Cell, 2009. **36**(3): p. 417-30.
380. Tsuchiya, Y., et al., *Involvement of the protein kinase CK2 in the regulation of mammalian circadian rhythms.* Sci Signal, 2009. **2**(73): p. ra26.
381. Iitaka, C., et al., *A role for glycogen synthase kinase-3beta in the mammalian circadian clock.* J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29397-402.
382. Schmutz, I., et al., *The mammalian clock component PERIOD2 coordinates circadian output by interaction with nuclear receptors.* Genes Dev, 2010. **24**(4): p. 345-57.
383. Kewley, R.J., M.L. Whitelaw, and A. Chapman-Smith, *The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators.* Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(2): p. 189-204.
384. Ueda, H.R., et al., *System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks.* Nat Genet, 2005. **37**(2): p. 187-92.
385. King, H.A., et al., *Structure of an enclosed dimer formed by the Drosophila period protein.* J Mol Biol, 2011. **413**(3): p. 561-72.
386. Kucera, N., et al., *Unwinding the differences of the mammalian PERIOD clock proteins from crystal structure to cellular function.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(9): p. 3311-6.
387. Merbitz-Zahradnik, T. and E. Wolf, *How is the inner circadian clock controlled by interactive clock proteins?: Structural analysis of clock proteins elucidates their physiological role.* FEBS Lett, 2015. **589**(14): p. 1516-29.
388. Ollinger, R., et al., *Dynamics of the circadian clock protein PERIOD2 in living cells.* J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 19): p. 4322-8.
389. Reits, E.A., et al., *Dynamics of proteasome distribution in living cells.* EMBO J, 1997. **16**(20): p. 6087-94.
390. Vielhaber, E., et al., *Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4888-99.
391. Kim, Y.I., et al., *Oxidized quinones signal onset of darkness directly to the cyanobacterial circadian oscillator.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(44): p. 17765-9.
392. Cremers, C.M. and U. Jakob, *Oxidant sensing by reversible disulfide bond formation.* J Biol Chem, 2013. **288**(37): p. 26489-96.
393. Albrecht, U., et al., *The multiple facets of Per2.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2007. **72**: p. 95-104.
394. Schafer, F.Q. and G.R. Buettner, *Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple.* Free Radic Biol Med, 2001. **30**(11): p. 1191-212.
395. Palmerini, C.A., G. Arienti, and R. Palombari, *Determination of S-nitrosohemoglobin using a solid-state amperometric sensor.* Nitric Oxide, 2000. **4**(6): p. 546-9.
396. Sadler, T.R., et al., *Snap-frozen brain tissue sections stored with desiccant at ambient laboratory conditions without chemical fixation are resistant to degradation for a minimum of 6 months.* Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2009. **17**(2): p. 165-71.
397. Ye, R., et al., *Biochemical analysis of the canonical model for the mammalian circadian clock.* J Biol Chem, 2011. **286**(29): p. 25891-902.
398. Burgoyne, J.R., O. Oviosu, and P. Eaton, *The PEG-switch assay: a fast semi-quantitative method to determine protein reversible cysteine oxidation.* J Pharmacol Toxicol Methods, 2013. **68**(3): p. 297-301.
399. Jaffrey, S.R., et al., *Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(2): p. 193-7.
400. Radi, R., *Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects.* Acc Chem Res, 2013. **46**(2): p. 550-9.
401. Patel, S.A., et al., *Calorie restriction regulates circadian clock gene expression through BMAL1 dependent and independent mechanisms.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 25970.

402. Wolhuter, K. and P. Eaton, *How widespread is stable protein S-nitrosylation as an end-effector of protein regulation?* Free Radic Biol Med, 2017.
403. Kunieda, T., et al., *Reduced nitric oxide causes age-associated impairment of circadian rhythmicity.* Circ Res, 2008. **102**(5): p. 607-14.
404. Yagita, K., et al., *Dimerization and nuclear entry of mPER proteins in mammalian cells.* Genes Dev, 2000. **14**(11): p. 1353-63.
405. Sang, Y., et al., *N-terminal domain-mediated homodimerization is required for photoreceptor activity of Arabidopsis CRYPTOCHROME 1.* Plant Cell, 2005. **17**(5): p. 1569-84.
406. Chaves, I., et al., *The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals.* Annu Rev Plant Biol, 2011. **62**: p. 335-64.
407. Wang, Z., et al., *Intermolecular recognition revealed by the complex structure of human CLOCK-BMAL1 basic helix-loop-helix domains with E-box DNA.* Cell Res, 2013. **23**(2): p. 213-24.
408. Pandini, A. and L. Bonati, *Conservation and specialization in PAS domain dynamics.* Protein Eng Des Sel, 2005. **18**(3): p. 127-37.
409. Gustafson, C.L. and C.L. Partch, *Emerging models for the molecular basis of mammalian circadian timing.* Biochemistry, 2015. **54**(2): p. 134-49.
410. Wang, M., et al., *The zebrafish period2 protein positively regulates the circadian clock through mediation of retinoic acid receptor (RAR)-related orphan receptor alpha (Roralpha).* J Biol Chem, 2015. **290**(7): p. 4367-82.
411. Toh, K.L., et al., *An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome.* Science, 2001. **291**(5506): p. 1040-3.
412. Kumar, S., et al., *An ecdysone-responsive nuclear receptor regulates circadian rhythms in Drosophila.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 5697.
413. Jaumouille, E., et al., *Transcriptional regulation via nuclear receptor crosstalk required for the Drosophila circadian clock.* Curr Biol, 2015. **25**(11): p. 1502-8.
414. Layeghifard, M., et al., *Evolutionary mechanisms underlying the functional divergence of duplicate genes involved in vertebrates' circadian rhythm pathway.* Gene, 2008. **426**(1-2): p. 65-71.
415. von Schantz, M., A. Jenkins, and S.N. Archer, *Evolutionary history of the vertebrate period genes.* J Mol Evol, 2006. **62**(6): p. 701-7.
416. Gekakis, N., et al., *Isolation of timeless by PER protein interaction: defective interaction between timeless protein and long-period mutant PERL.* Science, 1995. **270**(5237): p. 811-5.
417. Landskron, J., et al., *A role for the PERIOD:PERIOD homodimer in the Drosophila circadian clock.* PLoS Biol, 2009. **7**(4): p. e3.
418. Militi, S., et al., *Early doors (Edo) mutant mouse reveals the importance of period 2 (PER2) PAS domain structure for circadian pacemaking.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(10): p. 2756-61.
419. Ladenstein, R. and B. Ren, *Protein disulfides and protein disulfide oxidoreductases in hyperthermophiles.* FEBS J, 2006. **273**(18): p. 4170-85.
420. Rubinstein, R. and A. Fiser, *Predicting disulfide bond connectivity in proteins by correlated mutations analysis.* Bioinformatics, 2008. **24**(4): p. 498-504.
421. Bhattacharyya, R., D. Pal, and P. Chakrabarti, *Disulfide bonds, their stereospecific environment and conservation in protein structures.* Protein Eng Des Sel, 2004. **17**(11): p. 795-808.
422. Okano, S., et al., *Characterization of age-associated alterations of islet function and structure in diabetic mutant cryptochrome 1 transgenic mice.* J Diabetes Investig, 2013. **4**(5): p. 428-35.
423. Okano, S., et al., *Non-obese early onset diabetes mellitus in mutant cryptochrome1 transgenic mice.* Eur J Clin Invest, 2010. **40**(11): p. 1011-7.

424. Okano, S., et al., *Unusual circadian locomotor activity and pathophysiology in mutant CRY1 transgenic mice.* Neurosci Lett, 2009. **451**(3): p. 246-51.
425. Xing, W., et al., *SCF(FBXL3) ubiquitin ligase targets cryptochromes at their cofactor pocket.* Nature, 2013. **496**(7443): p. 64-8.
426. Goldfarb, A.N., K. Lewandowska, and M. Shoham, *Determinants of helix-loop-helix dimerization affinity. Random mutational analysis of SCL/tal.* J Biol Chem, 1996. **271**(5): p. 2683-8.
427. Amoutzias, G.D., et al., *Reduction/oxidation-phosphorylation control of DNA binding in the bZIP dimerization network.* BMC Genomics, 2006. **7**: p. 107.
428. Danciu, T.E. and M. Whitman, *Oxidative stress drives disulfide bond formation between basic helix-loop-helix transcription factors.* J Cell Biochem, 2010. **109**(2): p. 417-24.
429. Pognonec, P., H. Kato, and R.G. Roeder, *The helix-loop-helix/leucine repeat transcription factor USF can be functionally regulated in a redox-dependent manner.* J Biol Chem, 1992. **267**(34): p. 24563-7.
430. Baidanoff, F.M., et al., *N-nitrosomelatonin enhances photic synchronization of mammalian circadian rhythms.* J Neurochem, 2014. **129**(1): p. 60-71.
431. Sun, J., et al., *Regulation of the cardiac muscle ryanodine receptor by O(2) tension and S-nitrosoglutathione.* Biochemistry, 2008. **47**(52): p. 13985-90.
432. Dulhunty, A.F., et al., *Regulation of the cardiac muscle ryanodine receptor by glutathione transferases.* Drug Metab Rev, 2011. **43**(2): p. 236-52.
433. Wood, T.L., et al., *The KaiA protein of the cyanobacterial circadian oscillator is modulated by a redox-active cofactor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(13): p. 5804-9.
434. Ivleva, N.B., et al., *Quinone sensing by the circadian input kinase of the cyanobacterial circadian clock.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(46): p. 17468-73.
435. Cohen, S.E. and S.S. Golden, *Circadian Rhythms in Cyanobacteria.* Microbiol Mol Biol Rev, 2015. **79**(4): p. 373-85.
436. Schafmeier, T. and A.C. Diernfellner, *Light input and processing in the circadian clock of Neurospora.* FEBS Lett, 2011. **585**(10): p. 1467-73.