



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EXPRESIÓN TEMPORAL DE ARNTL & PER2 EN GLIOMA C6

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Emely Maqueda Martínez

TUTOR PRINCIPAL

Aliesha Araceli González Arenas

Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Lorena Aguilar Arnal

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Marco Antonio Velasco Velázquez

Facultad de Medicina

Ciudad de México. Abril, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A CONACyT por otorgarme la beca 788682 durante mis estudios en el Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Agradezco al Dr. Joaquín Manjarrez Marmolejo (Fisiología de la Formación Reticular, INNN), a la Dra. Margarita Gómez Chavarín (Facultad de Medicina, UNAM), al Dr. Miguel Tapia Rodríguez (Unidad de microscopía, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) y al M. en C. Juan Francisco Duarte Campos por su asesoramiento técnico en el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Aliesha González Arenas (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), directora del proyecto, por su asesoría y constante supervisión durante el desarrollo del mismo, así como permitirme participar en la formación de Abirán Fernando Mejía Peralta, quien me apoyó experimentalmente. A mi comité tutor conformado por la Dra. Lorena Aguilar Arnal (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) y el Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez (Facultad de Medicina, UNAM), por la constante revisión y enriquecimiento del trabajo.

Sitio donde se desarrolló el proyecto.

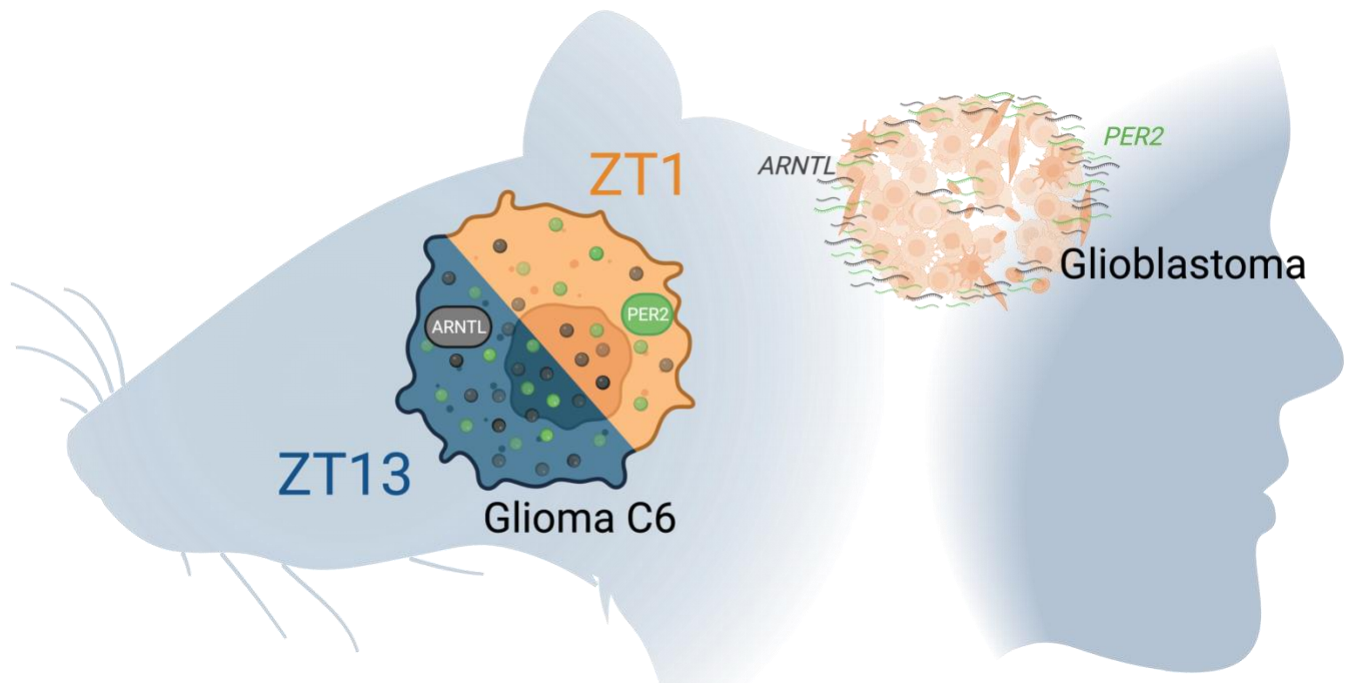
Laboratorio C-138, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Nueva sede, UNAM.

Resumen

El glioblastoma es el tumor maligno más común del sistema nervioso central. El ciclo circadiano desempeña un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de este tumor, por lo cual este trabajo se centra en analizar la relación del volumen tumoral con el contenido de dos de las proteínas que conforman el *core* circadiano: el regulador positivo, ARNTL, y el regulador negativo, PER2, a dos tiempos de zeitgeber en un modelo de glioma murino.

En el análisis *in silico*, se encontró una disminución significativa en la expresión de *ARNTL* y un aumento significativo en la expresión de *PER2*, lo que contrasta con los resultados de otros estudios. Sin embargo, se ha reportado que existen múltiples procesos alterados en el glioblastoma, lo que podría explicar la discrepancia en los resultados. Además, se identificó que la expresión de *ARNTL* & *PER2* depende de la subpoblación celular del glioblastoma. Utilizando un modelo *in vivo* de glioblastoma se encontró que el volumen tumoral no se relaciona con los niveles de las proteínas ARNTL & PER2, sin embargo, el glioma presenta un mayor contenido de estas proteínas respecto al control, el cual es dependiente del tiempo, indicando una complejidad de los mecanismos involucrados en la relación entre el ciclo circadiano y el desarrollo del glioblastoma. En conjunto, nuestros resultados demuestran la importancia de seguir estudiando la biología del ciclo circadiano en el glioblastoma, al encontrar cambios dependientes del tiempo y de las subpoblaciones del tumor.

Abstract



- In C6 glioma there is a time-dependent increase in ARNTL and PER2 protein content.
- In glioblastoma there is a decrease in ARNTL and PER2 expression in the core of the tumor.
- Changes in ARNTL & PER2 do not correlate with tumor volume.

Lista de Figuras

Figura 1. Terminología de los Ritmos Biológicos.	1
Figura 2. Anatomía y Expresión de Neuropeptidos en el Núcleo Supraquiasmático de Mamíferos.	2
Figura 3. Reloj Circadiano Molecular.	4
Figura 4. Reprogramación Circadiana en Células Troncales de Glioblastoma.	8
Figura 5. Desarrollo de Glioma C6 a dos Zeitgeber.	14
Figura 6. Densidad de ARNTL en Glioma C6 a dos Zeitgeber.	15
Figura 7. Relación de ARNTL con el Volumen Tumoral.	16
Figura 8. Densidad de PER2 en Glioma C6 a dos Zeitgeber.	18
Figura 9. Relación de ARNTL con el Volumen Tumoral.	19
Figura 10. Perfil de Expresión de ARNTL & PER2 en Pacientes.	20

Índice

Resumen	II
Abstract.....	II
Lista de Figuras	III
Introducción	1
Antecedentes.....	1
Ciclo Circadiano	1
Gliomas	5
Justificación	9
Hipótesis.....	9
Objetivos	9
General	9
Particulares	9
Procedimiento Experimental	10
Cultivo Celular.....	10
Implante Ortotópico.....	10
Fijación de Cerebros & Cortes	10
Tinción de Nissl	11
Inmunofluorescencia	11
Western Blot.....	11
Microscopia & Análisis.....	12
Resultados.....	14
Desarrollo de Glioma C6	14
ANRTL & PER2 en Glioma C6.....	14
ARNTL & PER2 en Glioblastoma	19
Discusión	21
Conclusiones.....	22
Referencias.....	23
Anexos	27

Introducción

Antecedentes

Ciclo Circadiano

Los ciclos circadianos son ritmos biológicos endógenos con períodos cercanos a 24 horas (del latín *circa*-aproximadamente, *diem*-día). Los ritmos circadianos tienen la capacidad de sincronizarse con agentes ambientales denominados *zeitgeber* (del alemán *zeit*-tiempo, *geber*-dador) como ciclos de luz-oscuridad, alimento e interacciones sociales; y se caracterizan por conservar los periodos de oscilación aun cuando se retiran estos estímulos ambientales, así como por la capacidad de conservar el periodo de la oscilación en cambios de temperatura, característica denominada como compensación de la temperatura (Koukkari & Sothorn, 2006).

Las características de los ritmos circadianos constituyen una adaptación biológica, la cual permite una respuesta anticipada a procesos predecibles (Golombek & Rosenstein, 2010).

La cronobiología es la disciplina encargada del estudio de los ritmos biológicos, desde el mecanismo molecular hasta la organización en ecosistemas, donde el término ritmo es definido como un cambio repetitivo con un patrón, probabilidad y periodo similar. Para describir los ritmos se utilizan tres características: periodo, amplitud y fase (Figura 1). El término de tiempo de *zeitgeber* (ZT, por sus siglas en inglés) se emplea para designar los tiempos del estímulo sincronizador, donde ZT0 corresponde al inicio del estímulo y ZT12 al término del estímulo (Koukkari & Sothorn, 2006).

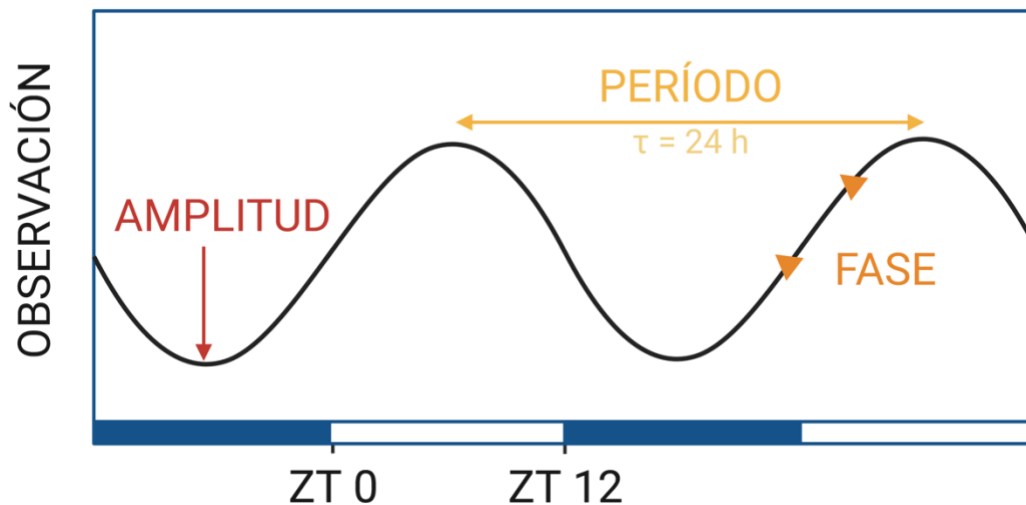


Figura 1. Terminología de los Ritmos Biológicos.

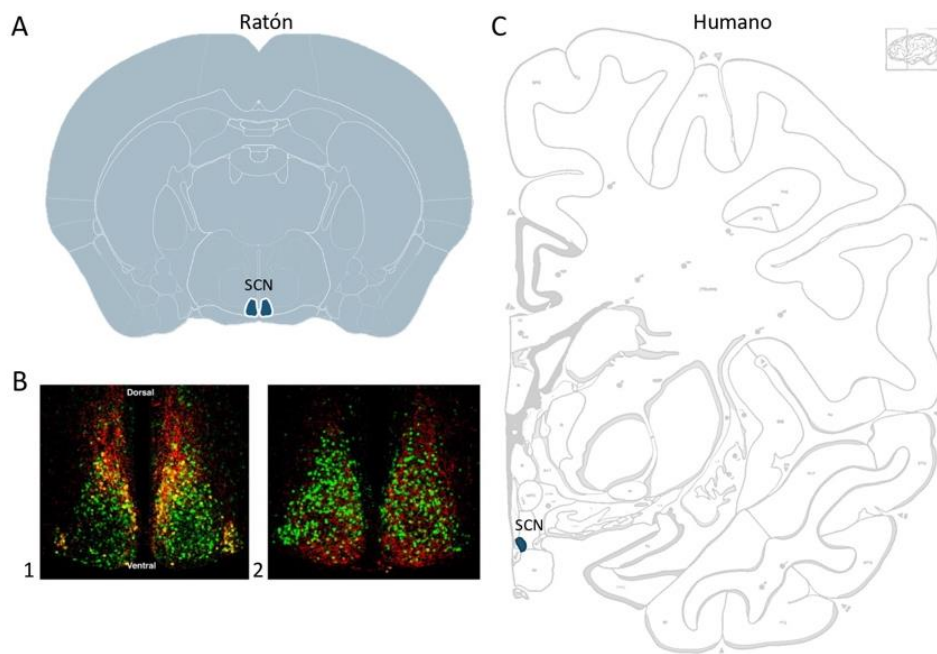
El periodo (τ) representa el tiempo requerido para completar un ciclo. La amplitud es la distancia de la media rítmica al pico del modelo matemático (coseno) utilizado para aproximar un ritmo. La fase indica la ubicación en el tiempo de un valor dentro del ritmo.

En mamíferos, las oscilaciones circadianas ocurren en todo el organismo. En la actualidad se considera como un sistema jerárquico en el cual el núcleo supraquiasmático (SCN, por sus siglas en inglés) del hipotálamo en el cerebro actúa como marcapasos para sincronizar los relojes periféricos en el resto del cuerpo. Los tejidos periféricos son capaces de mantener el ritmo circadiano, donde se observa un periodo y fase tejido específico (Koukkari & Sothorn, 2006).

El SCN consiste en dos núcleos conformados por aproximadamente 10,000 neuronas localizadas a cada lado del tercer ventrículo, directamente encima del quiasma óptico (Figura 2A-C). El SCN se divide en dos subregiones: ventrolateral & dorsolateral (Figura 2B), las cuales se diferencian por la distribución de los péptidos que expresan las neuronas en las proyecciones aferentes (Ma & Morrison, 2021).

La subregión ventrolateral expresa de manera rítmica el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) y el péptido liberador de gastrina (GRP). En ciclos de luz-oscuridad se observa un incremento de VIP en el periodo de oscuridad, mientras que durante el periodo de luz aumenta GRP. Este aumento es inducido por la estimulación del tracto retino hipotalámico por las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC) en la retina, las cuales expresan el fotorpigmento melanopsina (Takahashi, 2017). VIP y su receptor VPAC2, forman la vía de señalización clave en el SCN para mantener la sincronización interna del núcleo (Hasting et al., 2018).

Las neuronas de la subregión dorsolateral expresan arginina vasopresina (AVP), las cuales proyectan al núcleo paraventricular, permitiendo la coordinación circadiana en los tiempos de alimentación (Ma & Morrison, 2021).



La sincronización del SCN con los osciladores periféricos ocurre mediante las señales humorales, hormonales y neurales. Por ejemplo, la melatonina, una hormona secretada por la glándula pineal durante la fase nocturna, comienza a producirse por la reducción de la actividad en SCN (Pfeffer et al., 2018).

El ciclo circadiano puede sincronizarse incluso en modelos de cultivo celular. Dichos estímulos varían, por ejemplo, en cultivo de fibroblastos de ratón un estímulo con dexametasona o con análogos de glucocorticoides pueden actuar como zeitgeber. Cabe destacar que en estos modelos de cultivo el zeitgeber es dependiente del tipo celular (Mihelakis et al., 2022).

Reloj Circadiano Molecular.

En las células, el reloj circadiano a nivel molecular funciona a partir de circuitos de autorregulación transcripcional-traducciona. Este se conforma por un circuito principal (*core*) de activadores: la proteína de ciclos de salida del aparato locomotor circadiano kaput (CLOCK, por sus siglas en inglés), el receptor nuclear translocador de arilhidrocarburos (ARNTL, por sus siglas en inglés); represores: las proteínas criptocromo (CRY1-2), las proteínas periodo (PER1-3); y un circuito secundario por el receptor inverso erb (REV-ERB, por sus siglas en inglés) y el receptor huérfano del ácido retinoico (RORA, por sus siglas en inglés), los cuales se encargan de regular la expresión de los genes controlados por reloj (CCG, por sus siglas en inglés) (Sancar & Van-Gelder, 2021).

El heterodímero activador CLOCK/ARNTL está conformado por las proteínas ARNTL, cuya expresión génica es regulada por el circuito secundario y CLOCK, las cuales son reclutadas rítmicamente por la secuencia denominada caja-E o E-Box (5'-CACGTG-3') en los promotores de los CCG (Takahashi, 2017).

El heterodímero inhibidor CRY/PER está conformado por las respectivas proteínas, cuya expresión génica es regulada por el heterodímero activador. Estas proteínas se acumulan en el citoplasma hasta que pueden formar el heterodímero, interactuar con CK1 δ (caseína cinasa 1 δ) y se translocan al núcleo para reprimir la actividad transcripcional de CLOCK/ARNTL (Takahashi, 2017). Como consecuencia de dicha inhibición disminuyen los niveles de las proteínas represoras y en el ciclo inicia de nuevo (Figura 3).

En humanos, más del 50% de los genes son CCG, los cuales se encuentran regulados a nivel transcripcional, traducciona, post-traducciona; y participan en diversos procesos como la división celular y el metabolismo (Parnell et al., 2021). Adicionalmente, el reloj circadiano regula remodeladores epigenéticos de forma tejido-específico a nivel transcripcional. Dentro de estos remodeladores es importante destacar la actividad de CLOCK como acetiltransferasa de histonas, la interacción de CLOCK-ARNTL con la metiltransferasa de histonas MLL1 y la interacción de PER con NuRD, un remodelador de nucleosomas dependiente de ATP (Pacheco-Bernal et al., 2019).

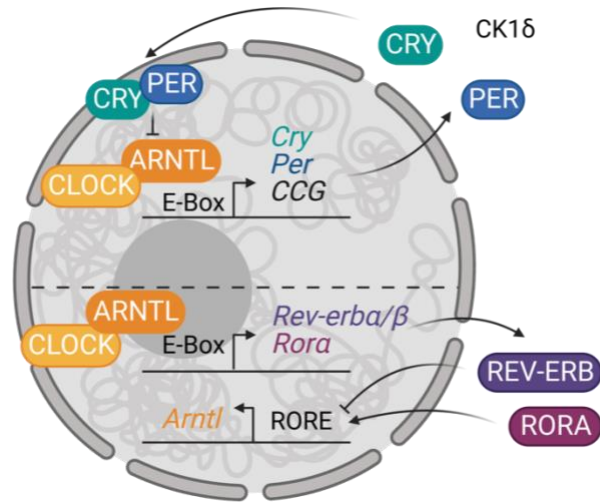


Figura 3. Reloj Circadiano Molecular.

Formación del circuito principal por el heterodímero activador ARNTL-CLOCK induciendo la transcripción y traducción de PER y CRY cuyo heterodímero inhibe la transcripción inducida por el heterodímero activador. El circuito secundario está conformado por la activación de la transcripción de ARNTL por RORA; así como la inhibición inducida por REV-ERB, cuya transcripción es dependiente de CLOCK-ARNTL. Adaptado de Sancar & Van-Gelder, 2021.

ARNTL/CLOCK.

Los activadores transcripcionales del ciclo circadiano en mamíferos se conforman por ARNTL, CLOCK y la proteína neuronal 2 con dominio PAS (NPAS2, por sus siglas en inglés), paróloga a CLOCK. La proteína ARNTL contiene un dominio hélice bucle hélice básica (bHLH), el cual permite la unión a la secuencia 5'-GTGA-3' del DNA, así como un par de dominios PAS que censan oxígeno, el potencial redox y la luz (Uniprot, O00327).

Al inicio de la transcripción circadiana, ARNTL en conjunto con CLOCK interactúan con la acetiltransferasa de histonas CBP (proteína de unión a CREB, por sus siglas en inglés) para acetilar las histonas y proporcionar un estado de cromatina accesible para la transcripción. Así mismo, ARNTL interactúa con TRAP150 (proteína 150 asociada al receptor de la hormona tiroidea), un coactivador que promueve la unión de ARNTL-CLOCK a CCG y vincula el heterodímero con el complejo mediador MED1 para reclutar la maquinaria transcripcional (Takahashi, 2016).

PER/CRY.

La familia de genes periodo y criptocromo son represores transcripcionales del ciclo circadiano. La proteína circadiana periódica homóloga 2 (PER2) contiene un dominio de unión a CRY y dos dominios PAS (Uniprot, O15055), idénticos a los de ARNTL, los cuales permiten reemplazar la interacción de CLOCK con ARNTL (Takahashi, 2016).

En la transición de la activación a la represión del ciclo circadiano, el complejo PER está asociado a un complejo NuRD dividido, el cual se une al heterodímero ARNTL-CLOCK asociado a la complementación de NuRD y así formar un complejo correpresor NuRD reconstituido para inhibir la transcripción de ARNTL-CLOCK (Takahashi, 2016).

En el pico de la represión, el complejo PER se asocia con los complejos represores SIN3-HDAC y HP1γ-SUV39H, los cuales contribuyen a la represión de ARNTL-CLOCK mediante la desacetilación de las histonas H3K9 y H4K5, así como la dimetilación y trimetilación de H3K9. En momentos posteriores a la fase de represión, el complejo PER se asocia a helicasas que promueven la terminación de la transcripción (Takahashi, 2016).

Ciclo Circadiano en Cáncer.

Dentro de los CCG se ha observado que entre los diferentes procesos celulares en los que participan se encuentran los mecanismos característicos del cáncer: evasión de supresores de crecimiento, inflamación promovida por el tumor, alteraciones genéticas, evasión de la destrucción inmunológica, inmortalidad replicativa, inestabilidad genómica/mutaciones, resistencia a la muerte celular, señal proliferativa sostenida, invasión y metástasis (Sulli et al., 2019).

La alteración del ritmo circadiano en humanos dado por la privación de sueño, jet-lag, trabajos 24 x 24 h y la exposición inusual por luz artificial han demostrado tener un impacto en varias funciones fisiológicas y trastornos, entre los que se incluye el cáncer (Battaglin et al., 2021).

Las alteraciones a nivel genético del reloj molecular han sido asociadas con el riesgo de desarrollar cáncer de acuerdo con diversos estudios epidemiológicos, sin embargo, los detalles moleculares de esta relación aún no se han elucidado; adicionalmente se ha observado que los cambios en el reloj molecular son tejido dependiente y la comunicación entre el core circadiano con los mecanismos celulares alterados en cáncer se presentan de manera bidireccional y específica (Sancar & Van-Gelder, 2021).

Gliomas

Los gliomas comprenden un grupo complejo y heterogéneo de tumores neuroepiteliales en el sistema nervioso central (Miller et al., 2021) los cuales son clasificados de acuerdo con su linaje celular de origen, diferenciación y grado de malignidad. Estos tumores incluyen astrocitomas, oligodendrocitomas, ependimomas, tumores mixtos, entre otros. De estos tumores, los astrocitomas son los más comunes, representando el 77.5% de todos los gliomas (Ostrom et al., 2021)

La clasificación gradual de los astrocitomas (grado I-IV) es establecida de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud en la Clasificación de tumores del sistema nervioso central, la cual asigna un grado de acuerdo con la histología y perfil molecular (Louis et al., 2016):

- Grado I. Astrocitomas pilocíticos y subependimarios, son de lento crecimiento y se caracterizan por la ausencia de mitosis, proliferación vascular y necrosis (Louis et al., 2007).
- Grado II. Astrocitomas difusos pilomixoides y xantastrocitomas pleomórficos, son de lento crecimiento y se caracterizan histológicamente por presentar calcificaciones, hiper celularidad y atipia nuclear (Louis et al., 2007).
- Grado III. Astrocitomas anaplásicos, son tumores infiltrantes y se caracterizan histológicamente por presentar hiper celularidad, anaplasia, atipia nuclear y células mitóticas (Louis et al., 2007).
- Grado IV. Glioblastomas, se caracterizan histológicamente por presentar hiper celularidad, atipia nuclear, mitosis, proliferación de microvasculatura o necrosis de tipo pseudopalisada (Louis et al., 2007).

La clasificación molecular se basa en el estado de metilación de O⁶-metilguanina metiltransferasa (MGMT), la cual está involucrada en la reparación del daño al DNA; mutaciones en el promotor de telomerasa transcriptasa reversa (TERT); mutaciones en isocitrato deshidrogenasa (IDH) (Louis et al., 2016). Estos marcadores son utilizados para determinar el pronóstico y la respuesta a determinados agentes quimioterapéuticos, como la temozolomida (TMZ).

Glioblastoma.

El astrocitoma de grado IV, también conocido como glioblastoma multiforme (GBM) es el más común y agresivo de los gliomas, además de caracterizarse por ser altamente heterogéneo. En la quinta edición de la OMS *Clasificación de tumores del sistema nervioso central*, publicado en 2021, el diagnóstico está establecido por las características histológicas, un perfil de IDH-WT, más la presencia de al menos uno de los siguientes parámetros genéticos: mutación en el promotor de *TERT*, amplificación de *EGFR*, ganancia del cromosoma 7p o pérdida del cromosoma 10q (Louis et al. 2021).

En México, la prevalencia de los astrocitomas es mayor en hombres que en mujeres, con una relación de 1.46 y de acuerdo con el estudio realizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en 2015, el GBM representa el 40% de los tumores malignos diagnosticados en el periodo comprendido de 1995-2014 (Aguirre-Cruz et al., 2020). A nivel mundial los GBM tienen una incidencia de 3.23 por 100,000 habitantes y se ha observado que aumenta en función de la edad, así como el grupo social de origen, donde se observa que hay una mayor frecuencia en adultos blancos no hispanos (Miller et al., 2021). En Estados Unidos representa el 59.5% de los tumores malignos cerebrales en adultos y es más frecuente en hombres que mujeres con una relación 1.6 a 1 (Low et al., 2022).

Dentro de la heterogeneidad el GBM puede clasificarse en tres niveles diferentes: nivel genético-transcripcional, nivel celular-tejido y nivel de localización del tumor (Paolillo et al., 2021):

Perfil Genético.

Diversos estudios genómicos han demostrado que dentro de los cambios relevantes en GBM comparados con tejido no neoplásico destacan las mutaciones en receptores EGFR, MET, PDGFRA; desregulaciones en la vía de señalización de PI3K, AKT; pérdida de supresores de tumores CDKN2A, TP53, RB, PTEN, NF; mutaciones en el promotor de TERT (Paolillo et al., 2021).

Subtipos Celulares.

La clasificación transcripcional presenta una estrecha relación con el pronóstico, la respuesta terapéutica, las alteraciones genómicas y el microambiente tumoral. Inicialmente se establecieron cuatro subtipos moleculares en el tumor: proneural, neural, clásico y mesenquimal (Verhaak et al., 2010). Posteriormente, mediante el uso de la firma de expresión génica intrínseca al GBM (GIE, por sus siglas en inglés), refinaron la clasificación de los tumores IDH-WT a tres subtipos GIE-mesenquimal, GIE-clásico y GIE-proneural (Wang et al., 2017).

A nivel unicelular, se han identificado cuatro estados plásticos de expresión de las células del GBM que asemejan a progenitores neurales, progenitores de oligodendrocitos, astrocitos y células mesenquimales (Nefitel et al., 2019).

Localización.

El GBM es comúnmente diagnosticado en los lóbulos del cerebro, con una frecuencia del 28.6% en lóbulo frontal, 24% lóbulo temporal, 15.3% lóbulo parietal, 3.9% lóbulo occipital, 3.9% cerebelo y 23.2% otras regiones del cerebro (Miller et al., 2021).

Tratamiento.

El pilar del tratamiento para pacientes con GBM es el enfoque quirúrgico, sin embargo, la resección completa del tumor a menudo no es posible debido a la naturaleza infiltrante del tumor y el riesgo de una resección agresiva que conlleva a déficits neurológicos postoperatorios. Además, al ser un tumor altamente difusivo, invasivo y vascularizado es necesario complementar la intervención quirúrgica con otro tratamiento; el tratamiento quimioterapéutico con TMZ, un profármaco oral de imidazotetrazina, induce la metilación del DNA y combinado con radioterapia, son el tratamiento estándar establecido (Wagner et al. 2021).

Sin embargo, el rápido crecimiento de estos tumores más posibles resistencias a las terapias convencionales se asocian con un mal pronóstico, presentando una media de supervivencia mundial de 12-15 meses para los pacientes con un GBM recién diagnosticado (Wagner et al.2021).

Ciclo Circadiano en Glioblastoma.

En GBM se ha identificado que el complejo CLOCK-ARNTL promueve la migración y proliferación de células tumorales (Li et al., 2013), así mismo se ha observado que el ritmo circadiano de ARNTL en las células tumorales permanece intacto y es necesario para el mantenimiento de la enfermedad (Battaglin et al., 2021). Adicionalmente, se ha identificado que la expresión de ARNTL correlaciona con el grado de severidad del glioma, pero no con la edad del paciente, sexo o tamaño del tumor (Wang et al., 2021).

En la cronoterapia de GBM, se ha observado que el tratamiento quimioterapéutico con TMZ administrado por la mañana durante 6 meses aumenta la supervivencia de pacientes con perfil MGMT metilada, en comparación con los pacientes a los que se les administra por la tarde (Damato et al., 2021).

Dentro de las poblaciones celulares que conforman al GBM, se observa que en las células troncales de glioblastoma (GSC) el *core* circadiano presenta una ganancia de control en la expresión de genes de metabolismo de glucosa, metabolismo de lípidos y CCG (Figura 4), adicionalmente el silenciamiento de ARNTL y la inhibición de proteínas del reloj circadiano en GSC disminuye la proliferación celular y la troncalidad de las células (Dong et al., 2019).

Por otra parte, se ha observado que en ratas con injerto heterotópico de células de glioma murino la arritmia circadiana por luz constante aumenta el volumen del tumor y el microambiente regula positivamente genes involucrados en lipogénesis, captación de glucosa y crecimiento tumoral (Guerrero-Vargas et al., 2017).

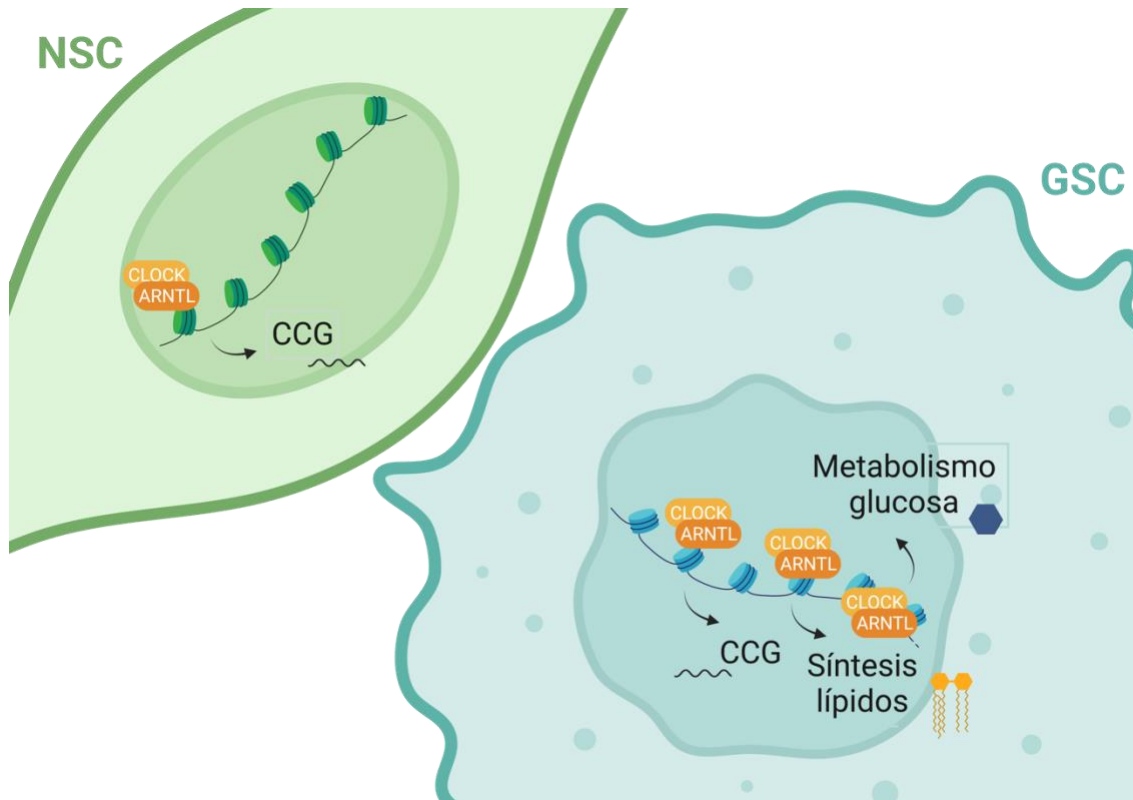


Figura 4. Reprogramación Circadiana en Células Troncales de Glioblastoma.

El heterodímero ARNTL-CLOCK en células troncales neuronales (NSC, por sus siglas en inglés), se une a regiones específicas del DNA para regular la transcripción de CCG; en células troncales de glioblastoma (GSC, por sus siglas en inglés), el heterodímero es esencial para la supervivencia de las células. Cambios en la compactación de la cromatina permiten que ARNTL-CLOCK se unan a más sitios en el DNA, promoviendo la expresión de genes implicados en la síntesis de lípidos y el metabolismo de la glucosa. La activación de estas vías metabólicas promueve la proliferación de GSC. Adaptado de Solanas & Benitah, 2019.

Justificación

Se ha reportado que los ciclos circadianos se encuentran alterados de manera diferencial en distintos tipos de cáncer.

Particularmente, en GBM se ha observado que el reloj circadiano es esencial para el desarrollo del tumor, por lo cual este trabajo se centra en analizar la relación del volumen tumoral con el contenido de dos de las proteínas que conforman el *core* circadiano: el regulador positivo, ARNTL, y el regulador negativo, PER2, a dos tiempos de zeitgeber en un modelo de glioma murino.

Hipótesis

En un modelo de glioma murino el volumen tumoral tendrá una relación directamente proporcional con la expresión de las proteínas del *core* circadiano, ARNTL & PER2.

Objetivos

General

Analizar el contenido de las proteínas del *core* circadiano, ARNTL & PER2 y su relación con el volumen tumoral a las cuatro semanas.

Particulares

- I. Evaluar el volumen tumoral.
- II. Evaluar el contenido de ARNTL & PER2 en ZT1 y ZT13.
- III. Evaluar la relación del contenido de ARNTL & PER2 con el volumen tumoral.
- IV. Evaluar la expresión de ARNTL & PER2 *in silico*.
- V. Identificar el perfil de expresión de ARNTL & PER2 como marcadores de sobrevida *in silico*.

Procedimiento Experimental

Cultivo Celular

La línea celular derivada de glioma de rata, C6, fue cultivada en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% a 37 °C, CO₂ al 5% y 95% de humedad, hasta una confluencia del 80%

Las células C6 son un glioma de alta malignidad el cual se caracteriza por una alta tasa de crecimiento, alta vascularización e infiltración, siendo un fenotipo similar al GBM, así como la sobreexpresión de EGFR (Giakoumettis et al., 2018). Adicionalmente, se ha observado que las células C6 conservan el ritmo circadiano en la expresión de genes del reloj molecular como *Arntl*, *Cry1*, *Per2*, *Per3*, *Rev-erbAα* de manera estable por lo cual podría ser útil para estudios del reloj circadiano (Fujioka et al., 2006).

Implante Ortotópico

El manejo, cuidado y procedimientos en animales fueron realizados según lo estipulado en la norma mexicana NOM-062-ZOO1999.

Se trabajó con ratas macho adultas de la cepa Wistar divididas en dos grupos experimentales, el grupo A (n = 4, por subgrupo) para experimentos de inmunofluorescencia y el grupo B (n = 3) para experimentos de westernblot, ambos grupos se mantuvieron en un ciclo luz-oscuridad 12:12 h con alimento y agua a saciedad.

Los miembros de ambos grupos experimentales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina (80/10 mg/Kg, ip). Se colocaron en el aparato estereotáxico y se realizó el implante en la corteza motora primaria, con coordenadas 1.6 mm anterior y 3 mm lateral izquierdo con respecto a Bregma a 2 mm de profundidad. El grupo A se subdividió en el subgrupo control con implante de solución salina 0.2 µL y el subgrupo glioma con implante de cien mil células C6 en un volumen de 5 µL. Para el grupo B se implantaron de cien mil células C6 en un volumen de 5 µL.

Posterior a la implantación se administró gentamicina local sobre la herida y por 48 h postcirugía se administró enrofloxacin (10 mg/Kg) adicionada al agua como profiláctico y meloxicam (0.85 mg/Kg, ip) como analgésico, antipirético y antiinflamatorio.

Fijación de Cerebros & Cortes

Transcurridas 4 semanas post-implantación, el grupo A se sacrificó por sobredosis con pentobarbital a ZT1, una hora después del encendido de la luz y ZT13, una hora después del apagado de la luz; se realizó un corte medio a la altura del esternón para exponer el corazón y perfundir vía intracardiaca con 1 mL/g de peso con solución salina, posteriormente con 1 mL/g de peso con paraformaldehído al 4%.

Los cerebros conservados en paraformaldehído se sumergieron en gradientes de sacarosa secuenciales de 10, 20 y 30 % con recambios cada 24 h, para su deshidratación. Se mantuvieron conservados en la solución de sacarosa 30% adicionada con azida de sodio al 0.01% a 4 °C hasta el día de corte.

Se realizaron cortes de 30 µm de espesor a -24 °C empleando un criostato (Leica CM1850), para lo cual los cerebros se sumergieron en medio FSC 22 Surgipath (Leica Microsystems) y se congelaron con hielo seco.

Los cortes se obtuvieron en cajas de 24 pozos sumergidos en una solución de crio preservación (etilenglicol 25%, glicerol 25%, PB 0.2 M 50%) a 4 °C hasta el análisis de proteínas por medio de la técnica de inmunofluorescencia.

Tinción de Nissl

Para identificar el tumor se realizó una tinción de Nissl en cortes de la muestra tumoral obtenidos en portaobjetos cubiertos con grenetina 3%. Los cortes de cerebro se rehidrataron en PBS 0.01 M durante 3 min. Posteriormente, se sumergieron en violeta de cresilo al 0.5% durante 2 min; inmediatamente después se sumergieron en agua ultra purificada Milli-Q durante 1 minuto para retirar el exceso de colorante. A continuación, las muestras fueron sumergidas en etanol al 70, 96 y 100%, sucesivamente, durante 2 min en cada concentración. Por último, se sumergieron en xileno durante 2 min y se colocó un cubreobjetos sobre los tejidos utilizando CytoSeal™ 60.

Inmunofluorescencia

Los cortes de cerebro se lavaron en PBS-Tritón X-100 durante 30 min. Posteriormente, se incubaron en una solución de citrato de sodio 10 mM a ebullición por 60 min, para la exposición de antígenos, subsecuentemente, se dejó enfriar los citratos por 30 min. Después, se incubaron durante la noche los anticuerpos primarios anti-Arntl (1:250, Abcam), anti-Per2 (1:600, Abcam) a 4°C en diluciones con PBS-Tritón X-100 0.3% y suero de cabra 3%. Finalmente, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios Alexa-Fluor 488 anti-conejo (1:1000, Life Technologies) durante 1 h y con Hoechst 33342 (1 µg/mL, Thermo Scientific) durante 10 min a temperatura ambiente. Los cortes se montaron sobre cubreobjetos cargados con medio de montaje no fluorescente Fluoromount-G (Southern Biotech). Entre los pasos experimentales se realizaron lavados por triplicado con una duración de 3 min cada uno, los lavados previos al anticuerpo primario se realizaron con PBS-Tritón X-100 al 0.3% y los lavados subsecuentes con PBS. Todos los pasos experimentales se realizaron en agitación, utilizando soluciones filtradas con membranas de polisulfona con poro de 0.45 µm (Millex-PES, Merck).

Western Blot

Transcurridas 4 semanas post-implantación, el grupo B se sacrificó por decapitación a ZT1, una hora después del encendido de la luz y ZT13, una hora después del apagado de la luz. Los cerebros se dividieron por hemisferio para obtener el glioma y corteza sin glioma (control), posteriormente las estructuras se homogeneizaron en 500 µL de amortiguador de lisis con inhibidores de proteasas (RIPA), las proteínas totales se obtuvieron por centrifugación a 14000 rpm, 4°C por 15 minutos y se cuantificaron por el método de Bradford. Posteriormente a 50 µg de proteína se les adicionó amortiguador de Laemmli y fueron separadas por electroforesis en SDS-PAGE 10% a 100 mV. Se incluyeron marcadores teñidos para la determinación del peso molecular. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa en condiciones semisecas durante 7 horas a 40 mA.

La membrana se sumergió en la solución de bloqueo, leche descremada 5% por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario, anti-ARNTL (1:1000, Abcam) y anti-PER2 (1:1000, Abcam) por 24 horas a 4° C. Después del lavado con TBS-Tween 0.1%, se incubó con el anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo (1:30 000) conjugado con peroxidasa de rábano por 45 minutos a temperatura ambiente. El complejo proteína-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia y las membranas se revelaron por autorradiografía.

Para validar la caga de proteína en la membrana después de la detección de ARNTL y PER2, se trató la membrana con glicina ácida 2% por 1 hora a temperatura ambiente para retirar los complejos proteicos, técnica de stripping. Posteriormente se realizó el procedimiento anteriormente descrito, con las siguientes modificaciones: incubación de anticuerpo primario, α -tubulina (1: 1000) por 12 horas a 4° C; anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón (1:20 000) conjugado con peroxidasa de rábano.

Las bandas correspondientes a ARNTL, PER2 y α -tubulina, obtenidas de la revelación por autorradiografía, fueron sometidas a un análisis densitométrico mediante el programa Image J, para el análisis estadístico se normalizó el contenido de ARNTL y PER2 respecto al contenido de α -tubulina.

Microscopía & Análisis

Las muestras de inmunofluorescencia se visualizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX43 (Pennsylvania, E.U.A.). Se obtuvieron fotografías de cinco campos por cada corte, en el tumor y la corteza motora primaria, con un aumento de 60x. Las imágenes se adquirieron utilizando el software ImagePro Plus 7.0 y una cámara MicroPublisher 5.0 RTV (QImaging). El análisis de las imágenes, para determinar el número de células ARNTL+ y PER2+, y la fluorescencia celular total corregida (CTCF, por sus siglas en inglés) se realizó empleando los programas Adobe Photoshop® e ImageJ. Para obtener el valor de CTCF se aplicó la siguiente ecuación, a partir de los valores obtenidos por ImageJ (Fitzpatrick, 2014).

$$\text{CTCF} = \text{Densidad integrada} - (\text{Área celular} \times \text{Media de la fluorescencia de fondo})$$

Las muestras de la tinción de Nissl se visualizaron utilizando un microscopio estereoscópico VELAB. Se obtuvieron fotografías del tumor en cada corte con un aumento de 2x. Las imágenes se adquirieron utilizando el software CamoStudio y una cámara digital 12 MP (Apple iPhone SE 2020).

Para obtener el volumen tumoral (V) se obtuvo el área tumoral (A) con Image J y a partir de la ecuación de volumen con área de sección transversal constante se aproximó el volumen tumoral (Lopez-Bertoni et al., 2022).

$$V = \int_b^a A(x)dx$$

Estadística

Para detectar las diferencias entre los experimentos, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. Esta prueba permitió identificar los cambios que se presentaron en función del zeitgeber, la muestra y la interacción entre estas dos variables. Posteriormente se calcularon las diferencias significativas a través del método de Tukey de “Diferencia significativa honesta” con un intervalo de confianza del 95%.

Análisis *in silico*

Para estudiar los cambios en el perfil de expresión de los genes del *core* circadiano ARNTL y PER2 en GBM se llevó a cabo un análisis de la base de datos reportada por TCGA (The Cancer Genome Atlas), IvyGAP (Ivy Glioblastoma Atlas Project) & Bao (GSE48865) para muestras de pacientes; para muestras no neoplásicas se utilizó GTEX (Genotype-Tissue Expression).

Para el análisis se extrajeron los datos reportados de mRNA-Seq de los genes *ARNTL*, *PER2* en los grupos de muestras obtenidas de GBM (n = 256) y muestras obtenidas de la corteza cerebral (n = 209) como control no neoplásico. Para comparar el perfil de expresión de los genes del *core* circadiano entre grupos se comparó la media de éstos, representado en un gráfico nube de lluvia a través de R. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Welch para comparar medias de dos poblaciones independientes. Los valores de $p < 0.0001$ fueron considerados significativos.

Así mismo, a partir de la base TCGA se obtuvieron los datos de sobrevida en función de la expresión de los genes *ARNTL*, *PER2* para obtener los gráficos de Kaplan-Meier a través de R. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Además, los datos reportados por IvyGAP permitieron analizar la expresión del *core* circadiano en función de las diferencias histológicas del tumor: borde tumoral, células e infiltración tumorales.

Resultados

Desarrollo de Glioma C6

Para identificar las características físicas de los gliomas inicialmente se realizó una observación descriptiva de los cerebros con desarrollo de glioma C6, siendo característico un tumor sobresaliente de la superficie del cerebro con un aspecto blando, así como porciones necróticas y vascularizadas en ambos tiempos: ZT1 y ZT13 (Figura 5A). Posteriormente, se realizó un análisis de la masa encefálica respecto al peso total de la rata, donde se encontró que el grupo con glioma C6 presenta un aumento significativo respecto al grupo control (Figura 5B). Adicionalmente, se determinó el volumen tumoral (Figura 5C) sin encontrarse diferencias significativas entre los tiempos ZT1 y ZT13.

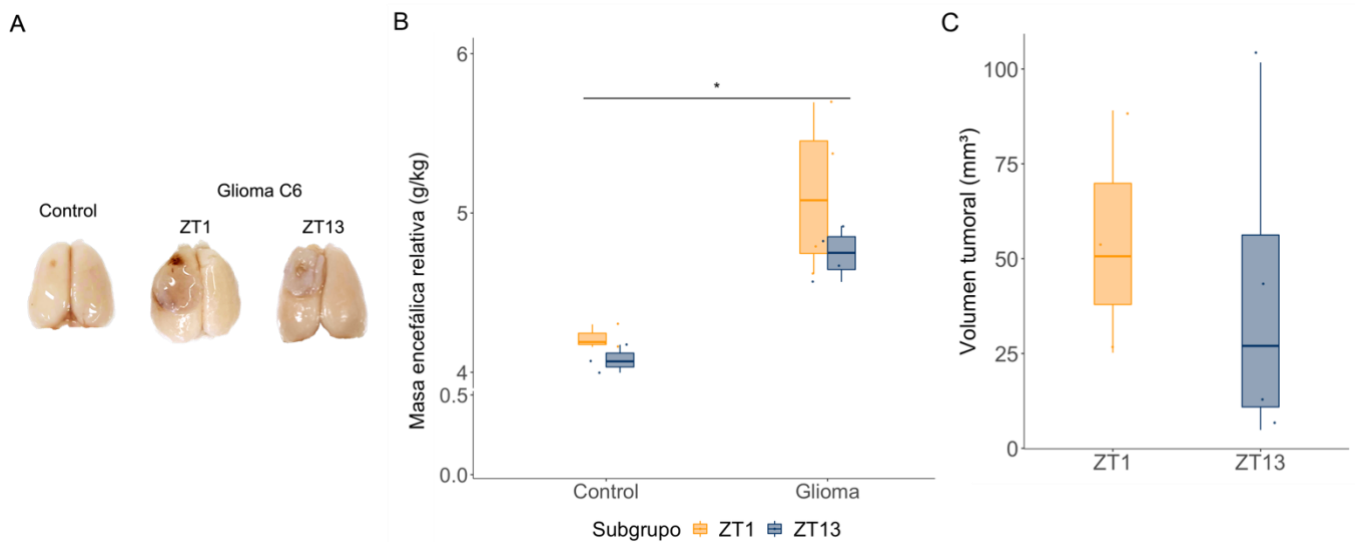


Figura 5. Desarrollo de Glioma C6 a dos Zeitgeber.

(A) Vista superior de los cerebros de rata con glioma C6 a ZT1 y ZT13 (B) Masa encefálica relativa a ZT1 y ZT13. Los resultados se representan como media \pm SD; Control n = 3; Glioma n = 4. Prueba ANOVA-TukeyHSD * p < 0.05 vs Control. (C) Volumen tumoral a ZT1 y ZT13. Los resultados se representan como media \pm SD; n = 4 por ZT. Prueba t de student * p < 0.05 vs ZT1.

ANRTL & PER2 en Glioma C6

La figura 6 muestra los resultados obtenidos a partir de los niveles de la proteína ARNTL en tejido mediante inmunofluorescencia a ZT1 y ZT13. En ambos grupos experimentales, se observó la presencia de células positivas para ARNTL con señal cercana al núcleo, mientras que en glioma C6 se encontró además en citoplasma (Figura 6A). El porcentaje de células ARNTL+ presentó diferencias significativas en función del ZT y de la muestra, encontrándose un aumento en glioma respecto al control, así como un aumento en ZT13 respecto a ZT1 (Figura 6B, **).

En particular, se identificó un aumento significativo en el glioma a ZT13 en comparación con el glioma a ZT1, y estos valores fueron mayores en comparación con el grupo control, donde igualmente las células ARNTL+ aumentan a ZT13 en comparación a ZT1 (Figura 6B, *). Estos resultados fueron validados mediante la técnica de western blot (ver Anexo 1).

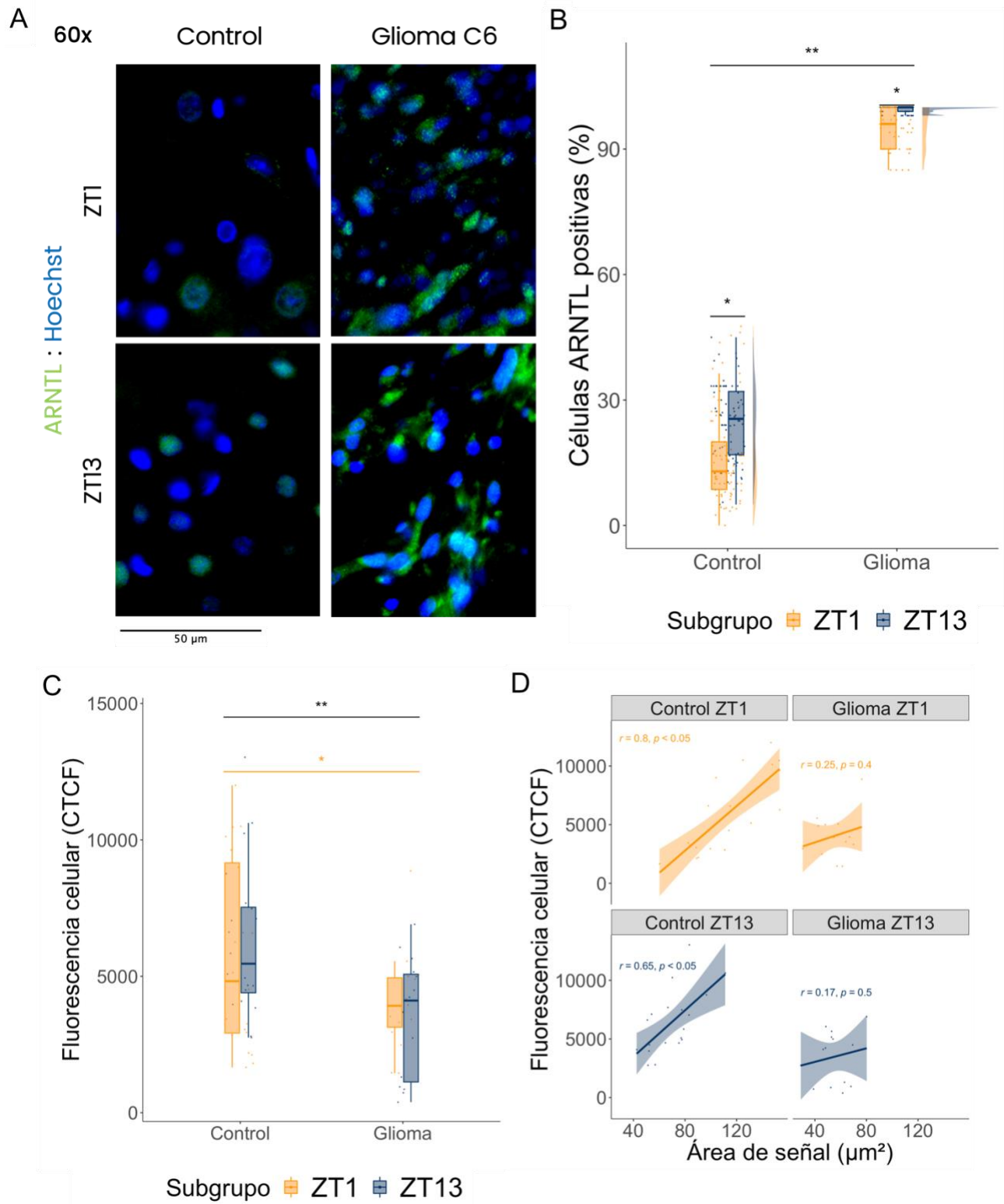


Figura 6. Densidad de ARNTL en Glioma C6 a dos Zeitgeber.

(A) Inmunofluorescencia representativa a 60x. ARNTL en verde y núcleos en azul. (B) Población de células ARNTL+ en ZT1 y ZT13. Los resultados se representan como media \pm SD; n = 4 por ZT. Prueba ANOVA-TukeyHSD * p < 0.05 vs ZT ** vs Control. 20 campos/n. (C) Fluorescencia celular de ARNTL en ZT1 y ZT13. Los resultados se representan como media \pm SD; n = 4 por ZT. Prueba ANOVA-TukeyHSD ** p < 0.05 vs Control * vs Control ZT1. 20 células/n. (D) Relación de la fluorescencia celular de ARNTL con el área de distribución de ésta en ZT1 y ZT13. Correlación de Pearson * p < 0.05.

Además de evaluar la población de células ARNTL+, también se determinó la intensidad de la fluorescencia en éstas, donde se encontró una diferencia significativa en función del ZT y la muestra, identificando una disminución en glioma respecto al control, así como un aumento en ZT13 respecto a ZT1 (Figura 6C, **). De manera particular, la fluorescencia celular es significativamente menor para el glioma ZT1 y ZT13 respecto al control en ZT1 (Figura 6C, *), así como un aumento significativo en el control a ZT13 respecto al control a ZT1 (Figura 6C, *). Estos resultados podrían indicar que hay mayor cantidad de células ARNTL+ en el glioma en ambos ZT, sin embargo, la expresión de proteína es menor a la del control.

Por otro lado, se estableció una relación entre el área de distribución de la señal de fluorescencia y la intensidad de ésta, en el grupo del glioma se encontró que la intensidad de la fluorescencia celular es independiente de su área de distribución, mientras que en el grupo control se encontró una relación directamente proporcional entre estas variables (Figura 6D). Estos resultados sugieren que la distribución de ARNTL en el grupo control es más homogénea en comparación con el glioma.

Por último, se relacionó la población ARNTL+ (Figura 7A) y la fluorescencia celular (Figura 7B) con su correspondiente volumen tumoral. Se encontró que ambos son independientes del volumen del tumor.

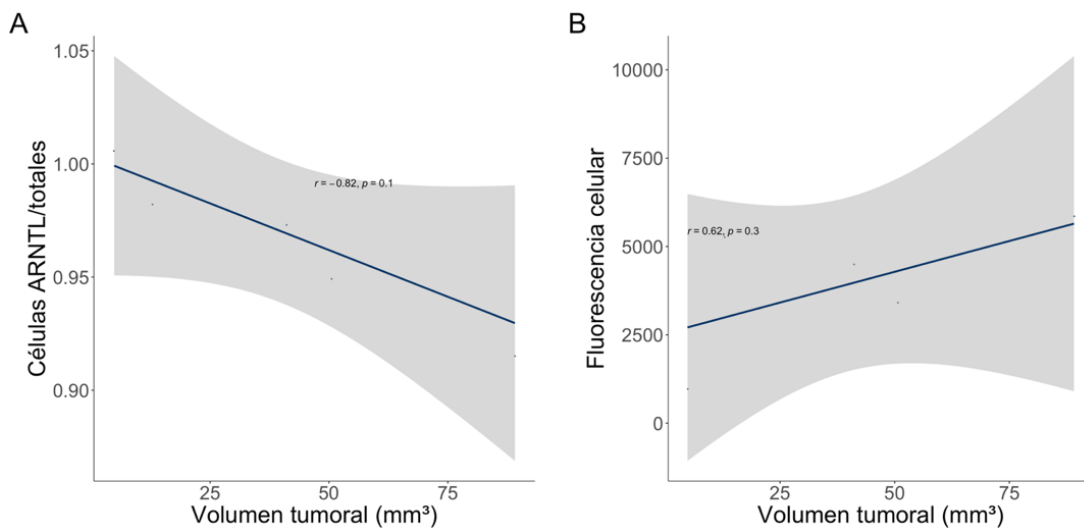


Figura 7. Relación de ARNTL con el Volumen Tumoral.

(A) Relación del volumen tumoral con células positivas ARNTL, independiente del ZT. Correlación de Pearson * $p < 0.05$. (B) Relación del volumen tumoral con la fluorescencia celular de ARNTL, independiente del ZT. Correlación de Pearson * $p < 0.05$.

Respecto a la proteína PER2, la figura 8 muestra los resultados obtenidos a partir de los niveles de la proteína PER2 en tejido mediante inmunofluorescencia a ZT1 y ZT13. En ambos grupos experimentales, se observó la presencia de células positivas para PER2 en citoplasma, mientras que en glioma C6 se encontró además señal cercana al núcleo (Figura 8A).

El porcentaje de células PER2+ presentó diferencias significativas en función del ZT y de la muestra, encontrándose un aumento en glioma respecto al control, así como un aumento en ZT13 respecto a ZT1 (Figura 8B, **). En particular, no se encontraron diferencias dependientes del tiempo de zeitgeber en glioma. Por otro lado, en el grupo control se identificó un aumento significativo en la expresión de células PER2+ a ZT13 respecto a ZT1 (Figura 8B, *). De manera exploratoria se determinó el contenido de PER2 a ZT1 mediante la técnica de western blot, donde no se encontraron cambios entre el glioma respecto al control (ver Anexo 2).

Además de evaluar la población de células PER2+, también se determinó la intensidad de la fluorescencia en éstas, donde se encontró una diferencia significativa en función del ZT y la muestra. Particularmente, la fluorescencia celular no es significativamente diferente entre ZT en un mismo grupo. Sin embargo, la fluorescencia en glioma a ZT1 y ZT13 es significativamente menor respecto a cada tiempo del grupo control (Figura 8C), lo cual sugiere una concentración menor de las proteínas en las células positivas, en comparación con el control.

Por otro lado, se estableció una relación entre el área de distribución de la señal de fluorescencia y la intensidad de ésta, donde se encontró que en el grupo del a ZT1 la intensidad de la fluorescencia celular es directamente proporcional al área de distribución, mientras que en el grupo control y glioma a ZT13 no se encontró una relación entre estas variables (Figura 8D). Estos resultados sugieren que la distribución de PER2 en el glioma a ZT1 es más homogénea en comparación con el resto de los grupos.

Por último, se relacionó la población PER2+ (Figura 9A) y la fluorescencia celular (Figura 9B) con su correspondiente volumen tumoral. Se encontró que ambos son independientes del volumen del tumor.

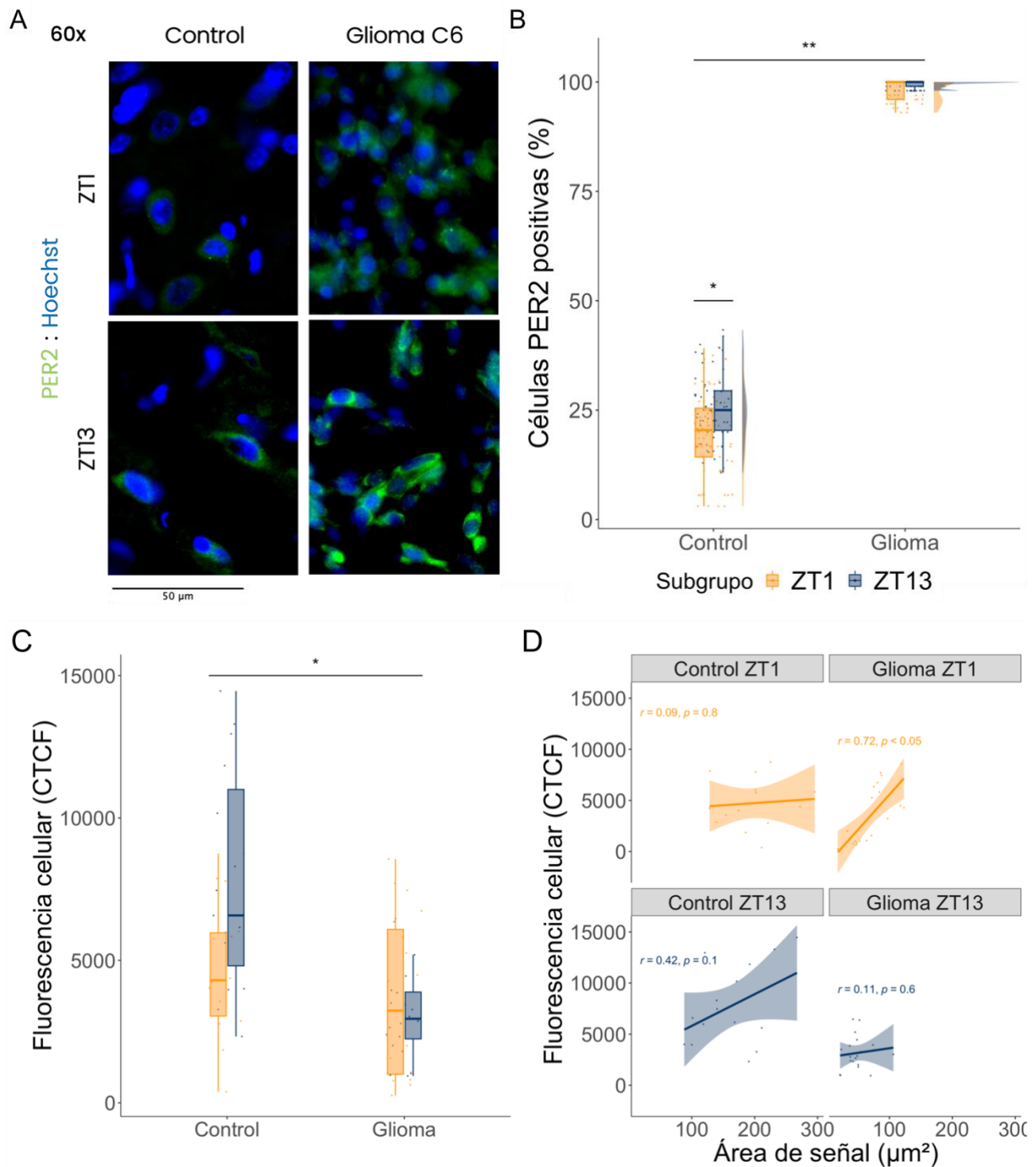


Figura 8. Densidad de PER2 en Glioma C6 a dos Zeitgeber.

(A) Inmunofluorescencia representativa a 60x. PER2 en verde y núcleos en azul. (B) Población de células PER2+ en ZT1 y ZT13. Los resultados se representan como media \pm SD; n = 4 por ZT. Prueba ANOVA-TukeyHSD * p < 0.05 vs ZT ** vs Control. 20 campos/n. (C) Fluorescencia celular de PER2 en ZT1 y ZT13. Los resultados se representan como media \pm SD; n = 4 por ZT. Prueba ANOVA-TukeyHSD * p < 0.05 vs Control. 20 células/n. (D) Relación de la fluorescencia celular de PER2 con el área de distribución de ésta en ZT1 y ZT13. Correlación de Pearson * p < 0.05.

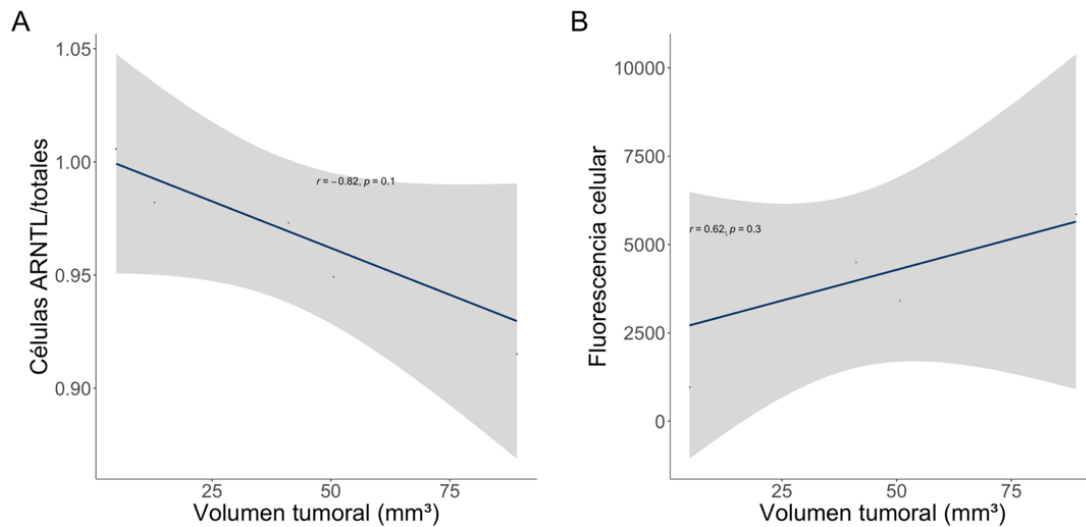


Figura 9. Relación de ARNTL con el Volumen Tumoral.

(A) Relación del volumen tumoral con células positivas ARNTL, independiente del ZT. Correlación de Pearson * $p < 0.05$. (B) Relación del volumen tumoral con la fluorescencia celular de ARNTL, independiente del ZT. Correlación de Pearson * $p < 0.05$

ARNTL & PER2 en Glioblastoma

A partir del análisis *in silico* de muestras de pacientes se evaluó el perfil de expresión de los genes del *core* circadiano *ARNTL* y *PER2*, donde se encontró una disminución significativa de *ARNTL* y un aumento significativo en la expresión de *PER2* con respecto a las muestras no tumorales. Así mismo para validación del análisis se encontró la sobreexpresión del biomarcador *EGFR*, receptor de crecimiento epidérmico (Figura 10A) el cual se encuentra sobreexpresado en GMB.

Adicionalmente, en el análisis de expresión entre las poblaciones histológicas del tumor, se encontró que la expresión de *ARNTL* es significativamente menor en las células tumorales (centro del tumor) respecto al borde tumoral, mientras que para *PER2* la expresión es significativamente menor en las células tumorales y la infiltración tumoral (transición del centro al borde del tumor), en comparación con el borde tumoral; como validación del análisis, se evaluó la expresión del regulador transcripcional maestro de la respuesta adaptativa a la hipoxia *HIF1A*, subunidad 1- α del factor inducible por hipoxia, como biomarcador de los niveles de oxígeno en las poblaciones celulares, se encontró un aumento significativo en las células tumorales y la infiltración tumoral en comparación con el borde tumoral (Figura 10B).

En las curvas de supervivencia de los perfiles de expresión de los genes del *core* circadiano se encontró que los cambios en la expresión de *ARNTL* y *PER2* no afectan la supervivencia para el GBM, tanto en un análisis general como en diferentes subclasificaciones de GBM; como lo es en el perfil IDH-WT, metilación del promotor *MGMT* (Figura 10C), en el cual se ha reportado mejora por cronoterapia (Damato et al., 2021).

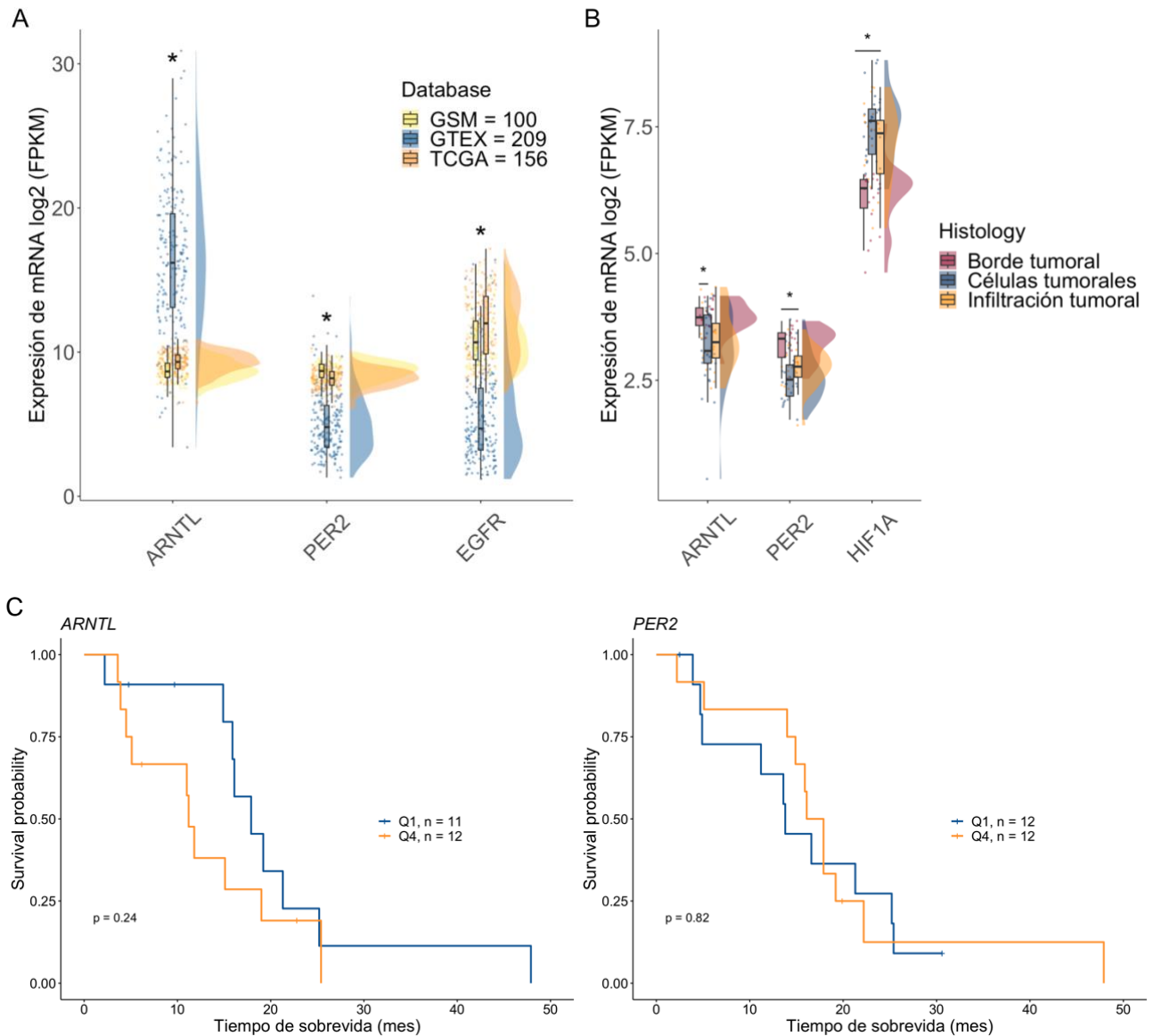


Figura 10. Perfil de Expresión de ARNTL & PER2 en Pacientes.

(A) Corteza cerebral (GTEX) y Glioblastoma (TCGA & GSM). Expresión de los genes del *core* circadiano *ARNTL*, *PER2* y el biomarcador *EGFR*. Prueba t de Welch * $p < 0.0001$ vs GTEX. (B) Expresión de *ARNTL*, *PER2* y el biomarcador *HIF1A* en poblaciones histológicas de GBM. Prueba ANOVA-TukeyHSD * $p < 0.005$ vs Borde tumoral. (C) Curvas de sobrevivida de *ARNTL* y *PER2* por cuartiles: Q1, azul = expresión alta; Q4, naranja = expresión baja, en pacientes con GBM IDH-WT metilación *MGMT*.

Discusión

El glioblastoma es el tumor maligno más común del sistema nervioso central. El ciclo circadiano desempeña un papel fundamental en su desarrollo y mantenimiento (Dong et al., 2019). En el modelo murino de glioma C6 se encontró un aumento significativo en la población de células positivas para ARNTL & PER2, así como una distribución diferencial de las proteínas en la célula, lo que indica que en las células tumorales aumentan la expresión de estas proteínas con respecto a tejido no tumoral, lo que podría sugerir la importancia del ciclo circadiano en el desarrollo tumoral del glioma, como se ha reportado anteriormente.

En investigaciones previas, se encontró que la arritmia del ciclo circadiano en el implante heterotópico de células C6 aumenta el volumen tumoral después de 3 semanas debido a la alteración en el metabolismo del hospedero, lo que se refleja en la ganancia de peso (Guerrero-Vargas et al., 2017). Sin embargo, en este estudio, se descubrió que el implante ortotópico no se correlaciona con un aumento significativo en el peso del hospedero en comparación con el control. Además, se encontró que el volumen tumoral no se relaciona con el contenido de las proteínas ARNTL & PER2. En glioblastoma se ha identificado un aumento en el contenido de ARNTL, el cual se asocia directamente con el edema peri tumoral, un rasgo característico de los tumores cerebrales (Wang et al., 2021). Respecto a PER2, en modelos derivados de las líneas celulares U251 y U87 de glioblastoma, se demostró que PER2 regula la troncalidad, el crecimiento celular, la progresión y la migración de GSC, tanto *in vitro* como *in vivo*, a través de la regulación a la baja de la vía Wnt/ β -catenina (Ma et al., 2020). En conjunto estos resultados indican la complejidad de los mecanismos involucrados en la relación entre el ciclo circadiano y el desarrollo del glioblastoma.

En el análisis *in silico*, se encontró una disminución significativa en la expresión de ARNTL y un aumento significativo en la expresión de PER2 en comparación con pacientes, lo que contrasta con los resultados mencionados. Es fundamental tener en cuenta que en el glioblastoma existen múltiples procesos alterados, incluyendo el proceso postranscripcional, y que la abundancia de proteínas tiene una baja correlación con la expresión de mRNA (Stetson et al., 2020), lo que podría explicar la discrepancia en los resultados, así mismo es sustancial mencionar que en las bases de datos no se reportan los horarios de muestreo, así como las condiciones que podrían afectar el ritmo circadiano de cada uno de los pacientes, lo cual ya se ha demostrado tiene un impacto en la expresión de ARNTL & PER2.

En el análisis de las distintas poblaciones celulares presentes en el glioblastoma, se encontró que la expresión de ARNTL & PER2 se encuentra incrementada en el borde tumoral en comparación con el centro del tumor. Este aumento de la transcripción se correlaciona inversamente con la expresión del biomarcador de hipoxia HIF1 α . Se ha reportado que el glioblastoma presenta un centro tumoral hipóxico/necrótico, lo que favorece un fenotipo de troncalidad en los nichos peri necróticos altamente hipóxicos e induce la migración celular hacia el borde tumoral (Markwell et al., 2022). Además, se ha demostrado que el complejo CLOCK-ARNTL regula la angiogénesis en GBM a través de la transcripción de OMLFML3. Esto induce la transcripción de HIF1 α y, a su vez, HIF1 α induce la transcripción de POSTN, que promueve la angiogénesis tras la estimulación de las células endoteliales (Pang et al., 2023).

Estos resultados resaltan la importancia de identificar los diferentes procesos biológicos dependientes de la diversidad de poblaciones celulares en el glioblastoma. Además, estos hallazgos sugieren que la actividad del ciclo circadiano puede estar involucrada en la regulación de la migración celular en el glioblastoma y que la interacción entre el ciclo circadiano y la hipoxia puede ser vital en la progresión del tumor, como se ha demostrado en la angiogénesis (Pang et al., 2023).

En cuanto a la relevancia de *ARNTL* & *PER2* como biomarcadores en el glioblastoma, no se encontraron resultados significativos en términos de la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, se ha reportado que en este tumor la supervivencia puede no correlacionar a nivel genético, pero sí a nivel proteico (Yanovich-Arad et al., 2021). Por lo tanto, no se descarta completamente su papel como biomarcadores.

Se ha sugerido que las células gliales y neuronales interactúan en los circuitos circadianos, como se demostró en una investigación reciente en la que se describió que las neuronas y astrocitos pueden sincronizar el ciclo circadiano a través de GABA en poblaciones distales (Giantomasi et al., 2023). Por lo anterior, el estudio de cómo se integra el reloj circadiano entre poblaciones no neoplásicas y células tumorales podría proporcionar una mejor comprensión de la biología del glioblastoma y podrían ser relevantes en el desarrollo de terapias dirigidas a la interrupción del ciclo circadiano de las células tumorales como un enfoque para el tratamiento de este tipo de tumor.

Conclusiones

El volumen tumoral del glioma C6 no tiene una correlación con la expresión de las proteínas del core circadiano, *ARNTL* & *PER2*.

De manera particular, este trabajo permitió identificar que el glioma C6 presenta un mayor contenido de las proteínas *ARTNL* & *PER2*, el cual es dependiente del tiempo. Además, *in silico*, se identificó que la expresión de *ARNTL* & *PER2* depende de la subpoblación celular del glioblastoma.

Referencias

- Aguirre-Cruz, L., Rodríguez-Pérez, C. E., de la Cruz-Aguilera, D. L., Acosta-Castillo, G. I., Ruano-Calderón, L., Martínez-Moreno, M., & Sotelo, J. (2020). Epidemiología descriptiva y cambios en la frecuencia de tumores astrocíticos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México [Descriptive epidemiology and frequency variations of astrocytic tumors in the National Institute of Neurology and Neurosurgery of Mexico]. *Salud pública de Mexico*, 62(3), 255–261. <https://doi.org/10.21149/10680>
- Battaglin, F., Chan, P., Pan, Y., Soni, S., Qu, M., Spiller, E. R., Castanon, S., Roussos Torres, E. T., Mumenthaler, S. M., Kay, S. A., & Lenz, H. J. (2021). Clocking cancer: the circadian clock as a target in cancer therapy. *Oncogene* 40. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01778-6>
- Damato, A.R., Jingqin Luo, J., Katumba, R.G.N., Talcott, G.R., Rubin, J.B., Herzog, E.D. & Campian, J.L. (2021). Temozolomide chronotherapy in patients with glioblastoma: a retrospective single-institute study. *Neuro-Oncology Advances*, 3 (1). <https://doi.org/10.1093/oaajnl/vdab041>
- Dong, Z., Zhang, G., Qu, M., Gimple, R. C., Wu, Q., Qiu, Z., Prager, B. C., Wang, X., Kim, L. J. Y., Morton, A. R., Dixit, D., Zhou, W., Huang, H., Li, B., Zhu, Z., Bao, S., Mack, S. C., Chavez, L., Kay, S. A., & Rich, J. N. (2019). Targeting glioblastoma stem cells through disruption of the circadian clock. *Cancer Discovery*, 9(11), 1556–1573. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0215>
- Fujioka, A., Takashima, N., & Shigeyoshi, Y. (2006). Circadian rhythm generation in a glioma cell line. *Biochemical and biophysical research communications*, 346(1), 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.094>
- Giakoumettis, D., Kritis, A., & Foroglou, N. (2018). C6 cell line: the gold standard in glioma research. *Hippokratia*, 22(3), 105–112.
- Giantomasi, L., Ribeiro, J. F., Barca-Mayo, O., Malerba, M., Miele, E., De Pietri Tonelli, D., & Berdondini, L. (2023). Astrocytes actively support long-range molecular clock synchronization of segregated neuronal populations. *Scientific Reports*, 13(1), 4815. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31966-1>
- Golombek, D. A., & Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiological reviews*, 90(3). <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2009>
- Guerrero-Vargas, N.N., Navarro-Espíndola, R., Guzmán-Ruíz, M.A., Basualdo, M.D.C., Espitia-Bautista, E., López-Bago, A., Lascurain, R., Córdoba-Manilla, C., Buijs, R.M. & Escobar, C. (2017). Circadian disruption promotes tumor growth by anabolic host metabolism; experimental evidence in a rat model. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3636-3>
- Hastings, M. H., Maywood, E. S., & Brancaccio, M. (2018). Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(8), 453–469. doi:10.1038/s41583-018-0026-z
- Koukkari, W., & Sothorn, R. (2006). Introducing Biological Rhythms. In College of Biological Sciences University of Minnesota. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4701-5_2

Li, A., Lin, X., Tan, X., Yin, B., Han, W., Zhao, J., Yuan, J., Qiang, B., & Peng, X. (2013). Circadian gene clock contributes to cell proliferation and migration of glioma and is directly regulated by tumor-suppressive miR-124. *FEBS Letters*, 587(15), 2455–2460. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.018>

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*, 114(2), 97–109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>

Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica*, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>

Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffiatti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>

Low, J. T., Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Neff, C., Waite, K. A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2022). Primary brain and other central nervous system tumors in the United States (2014-2018): A summary of the CBRUS statistical report for clinicians. *Neuro-oncology practice*, 9(3), 165–182. <https://doi.org/10.1093/nop/npac015>

Ma MA, Morrison EH. Neuroanatomy, Nucleus Suprachiasmatic. [Updated 2021 Jul 31]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546664/>

Ma, D., Hou, L., Xia, H., Li, H., Fan, H., Jia, X., & Niu, Z. (2020). PER2 inhibits proliferation and stemness of glioma stem cells via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncology Reports*, 44(2), 533–542. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7624>

Markwell, S. M., Ross, J. L., Olson, C. L., & Brat, D. J. (2022). Necrotic reshaping of the glioma microenvironment drives disease progression. *Acta Neuropathologica*, 143(3), 291–310. <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02401-4>

Mihelakis, M., Ndikung, J., Oelgeschläger, M., & Ertych, N. (2022). The 4th dimension of in vitro systems Time to level up. *Environment International*, 164, 107256. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107256>

Miller, K. D., Ostrom, Q. T., Kruchko, C., Patil, N., Tihan, T., Cioffi, G., Fuchs, H. E., Waite, K. A., Jemal, A., Siegel, R. L., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2021). Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(5), 381–406. <https://doi.org/10.3322/caac.21693>

Mohawk, J. A., & Takahashi, J. S. (2011). Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *Trends in Neurosciences*, 34(7), 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.05.003>

Neftel, C., Laffy, J., Filbin, M. G., Hara, T., Shore, M. E., Rahme, G. J., Richman, A. R., Silverbush, D., Shaw, M. L., Hebert, C. M., Dewitt, J., Gritsch, S., Perez, E. M., Gonzalez Castro, L. N., Lan, X., Druck, N., Rodman, C., Dionne, D., Kaplan, A., ... Suvà, M. L. (2019). An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell*, 178(4), 835-849.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024>

Ostrom, Q. T., Price, M., Neff, C., Cioffi, G., Waite, K. A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2022). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015-2019. *Neuro-Oncology*, 24(5), v1–v95. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac202>

Pacheco-Bernal, I., Becerril-Pérez, F., & Aguilar-Arnal, L. (2019). Circadian rhythms in the three-dimensional genome: implications of chromatin interactions for cyclic transcription. *Clinical epigenetics*, 11(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0677-2>

Pang, L., Dunterman, M., Xuan, W., Gonzalez, A., Lin, Y., Hsu, W. H., Khan, F., Hagan, R. S., Muller, W. A., Heimberger, A. B., & Chen, P. (2023). Circadian regulator CLOCK promotes tumor angiogenesis in glioblastoma. *Cell Reports*, 42(2), 112127. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112127>

Paolillo, M., Comincini, S., & Schinelli, S. (2021). In vitro glioblastoma models: A journey into the third dimension. *Cancers*, 13(10), 1–25. <https://doi.org/10.3390/cancers13102449>

Parnell, A.A., De Nobrega, A.K. & Lyons, L.C. (2021). Translating around the clock: Multi-level regulation of post-transcriptional processes by the circadian clock. *Cellular Signalling*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.celsig.2020.109904>

Pfeffer, M., Korf, H. W., & Wicht, H. (2018). Synchronizing effects of melatonin on diurnal and circadian rhythms. *General and comparative endocrinology*, 258, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.05.013>

Sancar, A. & Van-Gelder, R.N. (2021). Clocks, cancer, and chronochemotherapy. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.abb0738>. PMID: 33384351

Solanas, G., & Benitah, S. A. (2019). Brain tumours reset their clocks. *Nature*, 574(7778), 337–338. <http://www.nature.com/articles/d41586-019-03042-0>

Stetson, L. C., Ostrom, Q. T., Schlatzer, D., Liao, P., Devine, K., Waite, K., Couce, M. E., Harris, P. L. R., Kerstetter-Fogle, A., Berens, M. E., Sloan, A. E., Islam, M. M., Rajaratnam, V., Mirza, S. P., Chance, M. R., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2020). Proteins inform survival-based differences in patients with glioblastoma. *Neuro-Oncology Advances*, 2(1), 1–11. <https://doi.org/10.1093/oaajnl/vdaa039>

Sulli, G., Tun, M., Lam, Y. & Panda, S. (2019). Interplay between Circadian Clock and Cancer: New Frontiers for Cancer Treatment. *Trends in Cancer*, 5 (8). <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.07.002>

Takahashi J. S. (2017). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature reviews. Genetics*, 18(3), 164–179. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.150>

Takahashi, J. S. (2016). Molecular Architecture of the Circadian Clock in Mammals. In P. Sassone-Corsi (Eds.) et. al., *A Time for Metabolism and Hormones*. (pp. 13–24). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27069-2_2

Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B. A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H. S., ... Cancer Genome Atlas Research Network (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell*, 17(1), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>

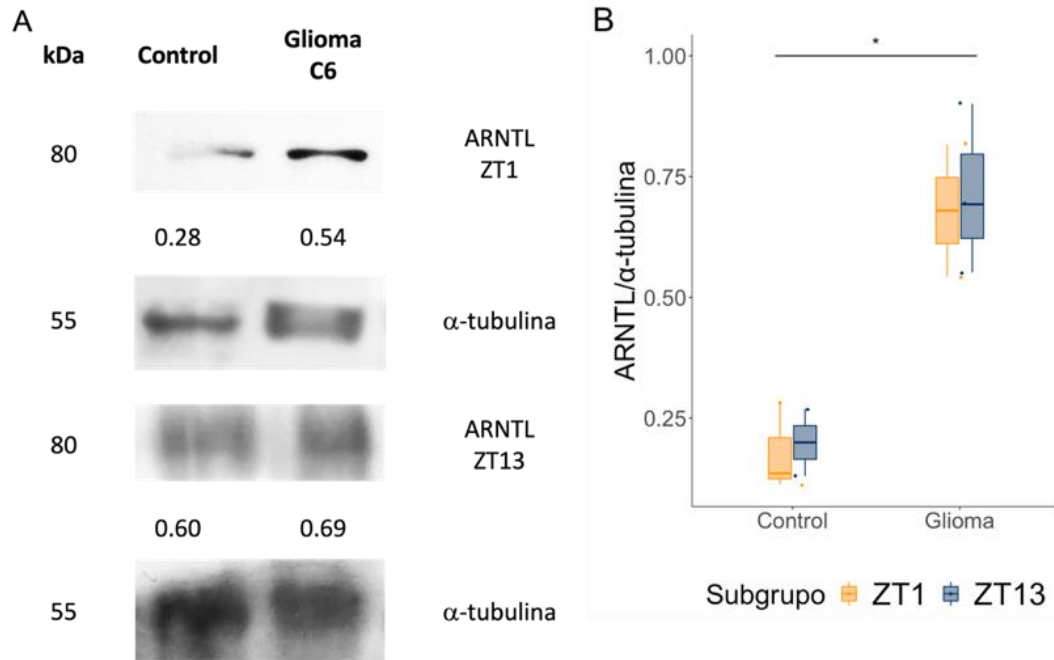
Wagner, P.M., Prucca, C.G., Velazquez, F.N., Sosa-Alderete, L.G., Caputto, B.L. & Guido, M.E. (2021). Temporal regulation of tumor growth in nocturnal mammals: In vivo studies and chemotherapeutical potential. *The FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.202001753R>

Wang, F., Li, C. Y., Han, F., Chen, L. A., & Zhu, L. (2021). BMAL1 may be involved in angiogenesis and peritumoral cerebral edema of human glioma by regulating VEGF and ANG2. *Aging*, 13(22), 24675–24685. <https://doi.org/10.18632/aging.203708>

Wang, Q., Hu, B., Hu, X., Kim, H., Squatrito, M., Scarpace, L., deCarvalho, A. C., Lyu, S., Li, P., Li, Y., Barthel, F., Cho, H. J., Lin, Y. H., Satani, N., Martinez-Ledesma, E., Zheng, S., Chang, E., Sauv e, C. E. G., Olar, A., ... Verhaak, R. G. W. (2017). Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*, 32(1), 42-56.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.06.003>

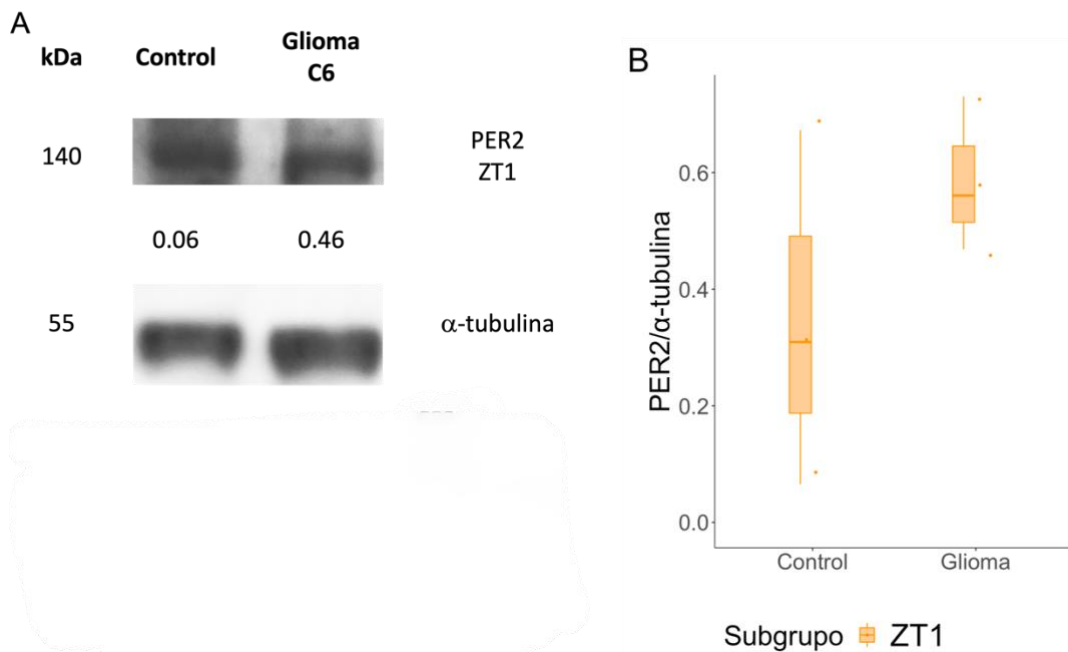
Yanovich-Arad, G., Ofek, P., Yeini, E., Mardamshina, M., Danilevsky, A., Shomron, N., Grossman, R., Satchi-Fainaro, R., & Geiger, T. (2021). Proteogenomics of glioblastoma associates molecular patterns with survival. *Cell Reports*, 34(9), 108787. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108787>

Anexos



Anexo 1. Contenido de ARNTL en Glioma C6.

(A) Western Blot representativo del contenido de ARNTL a ZT1 (superior) y ZT13 (inferior) en glioma C6 y control. (B) Análisis densitométrico a partir del Western Blot. Los resultados se representan como media \pm SD; n = 3 por grupo experimental. Prueba ANOVA-TukeyHSD * $p < 0.05$ vs Control.



Anexo 2. Contenido de PER2 en Glioma C6.

(A) Western Blot representativo del contenido de PER2 a ZT1 (superior) en glioma C6 y control. (B) Análisis densitométrico a partir del Western Blot. Los resultados se representan como media \pm SD; n = 3 por grupo experimental. Prueba ANOVA * $p < 0.05$ entre grupos.