



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**Desincronización de los relojes circadianos en el
cáncer.**

Desynchronization of circadian clocks in cancer.

Autor: Saúl Rico Marco

Director/es: D. Carlos Manuel Martínez Campa

Santander, Junio 2018

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. OBJETIVOS Y METODOLOGÍA	3
3. INTRODUCCIÓN	4
4. RELOJES BIOLÓGICOS.....	5
4.1 ¿QUÉ SON?.....	5
4.2 ¿DÓNDE ESTÁN?.....	6
4.3 ¿CÓMO FUNCIONAN?.....	7
4.3.1 Núcleo Supraquiasmático	7
4.3.2 Relojes celulares	7
4.4 ¿QUÉ PASA DURANTE LA NOCHE?	8
4.4.1 Funciones de la melatonina	9
4.4.2 Papel de la melatonina en el cáncer	10
5. LA LUZ COMO POTENCIAL CARCINÓGENO	11
5.1 CÁNCER DE PRÓSTATA	12
5.2 CÁNCER DE MAMA	13
6. GENES RELOJ	15
6.1 FUNCIONAMIENTO.....	15
6.1.1 Mecanismo molecular de los relojes circadianos	15
6.1.2 Relojes periféricos	17
7. PAPEL DE LOS GENES RELOJ EN EL CÁNCER	20
7.1 Funcionamiento normal de los genes reloj	21
7.2 Alteraciones de los genes reloj en el cáncer.....	23
7.3 Mecanismos alterados por la pérdida de la ritmicidad circadiana en la génesis del cáncer	24
7.3.1 Reparación del ADN y ritmicidad circadiana	24
7.3.2 Proliferación celular y el crecimiento de las células cancerígenas.....	25
7.3.3 Mecanismo de acción de los genes circadianos en el cáncer	25
7.3.4 Modificaciones de la epigenética en los genes reloj	27
7.4 Interacciones entre el entorno y los genes reloj.....	27
7.5 Genes reloj en la progresión del cáncer, metástasis y angiogénesis	28
8. GENES RELOJ Y CÁNCER	28
8.1 Per1	29
8.1.1 Carcinoma oral de células escamosas.....	29
8.1.2 Cáncer de pulmón.....	31
8.1.3 Cáncer de mama	31
8.1.4 Cáncer de próstata	32
8.1.5 Cáncer colorrectal.....	33
8.2 Per2	34
8.2.1 Carcinoma oral de células escamosas.....	34
8.2.2 Cáncer de pulmón.....	35
8.2.3 Cáncer de mama	36
8.2.4 Cáncer colorrectal.....	38
8.3 Bmal1/Arntl	39
8.3.1 Carcinoma oral de células escamosas.....	39
8.3.2 Cáncer de pulmón.....	39
8.3.3 Cáncer de mama	40
8.3.4 Cáncer colorrectal.....	40
9. CONCLUSIONES	41
10. AGRADECIMIENTOS	41
11. BIBLIOGRAFÍA	42

1. RESUMEN

Los relojes circadianos han sido desde hace mucho tiempo una de las grandes incógnitas de la biología moderna. Desde la primera observación en los ciclos de apertura y cierre de las plantas, hasta el premio Nobel de la Medicina y Fisiología de 2017, estos relojes han ido aportando con gran rapidez cada vez más evidencia de su importante papel en la biología de todos los seres vivos. Su participación en múltiples vías de regulación hormonal y del ciclo celular, así como de su dependencia del ciclo día/ noche natural, amenazado por el drástico cambio en el estilo de vida del ser humano actual, los convierten en objeto de estudio de un creciente número de investigaciones científicas en relación, sobretodo, con el cáncer.

Con este trabajo se pretende revisar el conocimiento actual del mecanismo de acción de los relojes circadianos, y hacer una revisión de la literatura científica que relaciona la alteración de estos relojes con el desarrollo de cáncer, para analizar la situación actual sobre este tema.

Palabras clave: “reloj circadiano”, “genes reloj”, “cáncer”, “melatonina”.

ABSTRACT

Circadian clocks have been for long one of the greatest unknowns of modern biology. From the first observation in the cycles of opening and closing of the plants, to the Nobel Prize in Medicine and Physiology of 2017, these clocks have been contributing with great rapidity more and more evidence of their important role in the biology of all beings alive. Their participation in multiple hormonal regulation and cell cycle pathways, as well as their dependence on the natural day/night cycle, threatened by the drastic change in the lifestyle of the current human being, make them an object of study of an increasing number of scientific research in relation, above all, to cancer.

This paper aims to review the current knowledge of the mechanism of action of circadian clocks, and make a review of the scientific literature that relates the alteration of these clocks with the development of cancer, to analyze the current situation on this subject.

Key words: "circadian clock", "clock genes", "cancer", "melatonin".

2. OBJETIVOS Y METODOLOGÍA

El presente trabajo es una revisión exhaustiva de los datos recogidos en la literatura sobre el conocimiento del mecanismo por el cual los relojes circadianos ejercen su actividad reguladora, así como de sus interacciones entre ellos, y de cómo su alteración puede influir en el desarrollo, crecimiento y diseminación de algunos tipos de cáncer. Para ello, se ha realizado una búsqueda bibliográfica utilizando como base de datos de referencia PubMed. La búsqueda se realizó utilizando, principalmente, las siguientes palabras: *Relojes circadianos; Genes reloj; Cáncer*. Los distintos bloques llevan, adicionalmente, otras palabras para centrar su búsqueda. Cabe resaltar el uso de las palabras: *PER1, PER2, BMAL1, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal*; que fueron usadas para desarrollar una parte más específica del trabajo. Los artículos que fueron incluidos se considera que ofrecen información relevante relacionada con los genes reloj y su relación con el cáncer. Las referencias bibliográficas de los artículos seleccionados, incluidos los estudios, investigaciones originales y otros artículos de interés se han analizado en busca de artículos adicionales de apoyo para la revisión.

El objetivo principal de este trabajo es armonizar una idea del caótico funcionamiento del reloj circadiano en los mamíferos y analizar de la forma más específica posible el conocimiento actual sobre la relación de los principales genes reloj con el desarrollo de cáncer. Al mismo tiempo se pretende valorar la posible aplicación al tratamiento del cáncer del conocimiento de estos genes.

3. INTRODUCCIÓN

La idea de la ritmicidad biológica está clásicamente mucho más arraigada al mundo de las plantas que al de los animales, ya que ha sido mucho más estudiada en éstas. Los primeros datos documentados pertenecen al astrónomo francés Jean-Jacques d'Ortous de Mairan, que encerró especímenes de *Mimosa púdica* en cajas en condiciones de oscuridad total. Bajo la influencia de la luz solar, las hojas de esta planta se mantienen extendidas durante el día y se retraen durante la noche. Pero cuando encerró estas plantas en cajas, seguían manteniendo los ciclos de cierre y apertura de las hojas. De Mairan postuló la existencia de un “reloj interno” capaz de regular su actividad en ausencia de luz solar, tal y como se recoge en *Histoire de l'Academie Royale des Ciencias (Paris 1729)*. Sin embargo, esta idea no fue bien aceptada por la comunidad científica de la época, argumentando que “seguramente entraba algo de luz por las cajas” o “quizás la planta responde a cambios de temperatura”.

Carl Linnaeus, botánico y naturalista sueco, ideó un peculiar reloj floral, descrito en su obra *Philosophia botanica (1751)*, reflejando en él las distintas variedades de plantas que florecen en cada una de las horas del día. Esto refuerza la idea de la ritmicidad biológica en las plantas.

Apenas unos años más tarde, dos botánicos franceses, Du Monceau y Zinn, demostraron en la obra *La Physique des arbres (1758)* que los movimientos de la *Mimosa pudica* eran independientes de la temperatura, aunque tampoco tuvieron mucho éxito frente a la comunidad científica del momento.

No fue hasta 1823, cuando De Candolle, un botánico genovés, repitió el experimento de De Mairan, según describe en su obra *Regni vegetabilis systema naturale*, confirmando sus resultados, pero añadiendo dos importantes conclusiones. La primera, que el ritmo de movimiento de las hojas aislado del medio no poseía un periodo exacto de 24 horas, sino algo menor. La segunda, que era posible invertir el ritmo biológico. Para ello colocó las plantas en oscuridad durante el día y las iluminó durante la noche, consiguiendo a los pocos días que se adaptasen al nuevo ciclo luz/oscuridad, de tal manera que las hojas pasaron a abrirse durante la noche y a cerrarse durante el día.

Sin embargo, aún tuvieron que pasar muchos años hasta que la idea de la existencia de “relojes internos” fuera admitida como una verdad científica. En 1880, Charles Darwin publicó el libro *The Power of Movements in Plants* en el que concluye que los cambios periódicos en la posición de las hojas son una propiedad “inherente” a la propia planta.

Como se puede apreciar hasta ahora, todos estos estudios pioneros se realizaron en plantas, por lo que durante mucho tiempo la existencia de estos “relojes internos” se consideró como una propiedad del reino vegetal. No fue hasta finales del siglo XIX cuando se publicaron las primeras observaciones sobre la existencia de ritmos diarios de temperatura corporal en trabajadores a turnos y soldados. En la década de los treinta se fundó la primera sociedad científica dedicada al estudio de los ritmos biológicos, *Society for Biological Rhythms*, y en 1960 se celebró en Cold Spring Harbor (USA), el primer simposio internacional sobre ritmos biológicos, considerado el nacimiento oficial de la cronobiología como rama de la biología con identidad propia.

En 1971 se llevó a cabo el que puede ser el experimento más trascendental y conocido realizado en animales, en relación a la localización del reloj biológico. Vino de la mano de Seymour Benzer y Ronald Konopka y consistió en inducir mutaciones en la descendencia procedente del cruzamiento de moscas del vinagre tratadas con diversas sustancias químicas. Algunas de estas nuevas moscas mostraban alteraciones en su ciclo normal de 24 horas. En algunas se acortó y en otras se alargó, pero se demostró que en todas estaba el mismo gen mutado (1).

Siguiendo el modelo anterior, en 1984, Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash y Michael W. Young, utilizaron el mismo modelo experimental (*Drosophila*) para aislar ese gen, al que llamaron “periodo” y que está asociado al control del ritmo biológico normal. Más tarde describieron que este gen y otros se autorregulan a través de sus propios productos generando oscilaciones de unas 24 horas, de tal forma que cada célula poseía su propio reloj interno autorregulado (2).

Hall, Rosbash y Young fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología por sus investigaciones sobre los ritmos circadianos y los genes y proteínas que participan en estos ciclos en 2017.

4. RELOJES BIOLÓGICOS

4.1 ¿QUÉ SON?

Hoy sabemos que los relojes internos son “productos” de la expresión de diversos genes, es decir, vamos a encontrarnos una serie de genes que, dependiendo del momento del día, van a expresarse o no, por lo que fueron denominados “genes reloj” (3).

El estilo de vida del ser humano del siglo XXI le expone a distintas situaciones con distintos niveles de exigencia a lo largo del día, por lo que no tendrá la misma temperatura corporal medida por la mañana y por la noche, al igual que no tendrá la misma activación metabólica o los mismos niveles de hormonas. Todo depende de las situaciones a las que nos enfrentemos en el momento, o mejor dicho, a las que tenemos previsto enfrentarnos (3).

Para hacer frente a todas estas situaciones, nuestro organismo tiene muy buena capacidad adaptativa. Ante un cambio en las necesidades fisiológicas (por ejemplo, al hacer ejercicio) rápidamente se detectan alteraciones (mayor consumo de oxígeno) y se pondrían en marcha las respuestas adaptativas correspondientes (aumento de la frecuencia cardíaca y pulmonar). Este sistema es fundamental para la adaptación (3).

No puede negarse que, a lo largo de la historia de la evolución, en todos los seres vivos, desde las plantas hasta los animales, ha sido crucial la influencia de los ritmos geofísicos. La duración del día a lo largo de toda la línea evolutiva del ser humano apenas ha sufrido variaciones, y esto influye en que llevemos una actividad con cierta “rutina” o “periodicidad” en nuestras funciones más básicas. Por ejemplo, habitualmente nos levantamos, trabajamos, nos alimentamos y nos dormimos, todo hacia la misma hora. Podríamos decir que nuestro organismo se prepara con antelación a las necesidades específicas previsibles para cada momento del día (3).

Poco antes de la hora a la que nos levantamos, la presión arterial, frecuencia cardíaca temperatura corporal y concentración sanguínea de cortisol comienzan a elevarse, mientras que la secreción gástrica aumentará hacia la hora a la que se suele comer. Estas respuestas no son “reactivas”, sino “predictivas”, es decir, se anticipan a las demandas previstas para cada momento del día. No se producen en respuesta a los cambios medioambientales, sino que son controlados por un reloj interno y por lo tanto están genéticamente determinados (3).

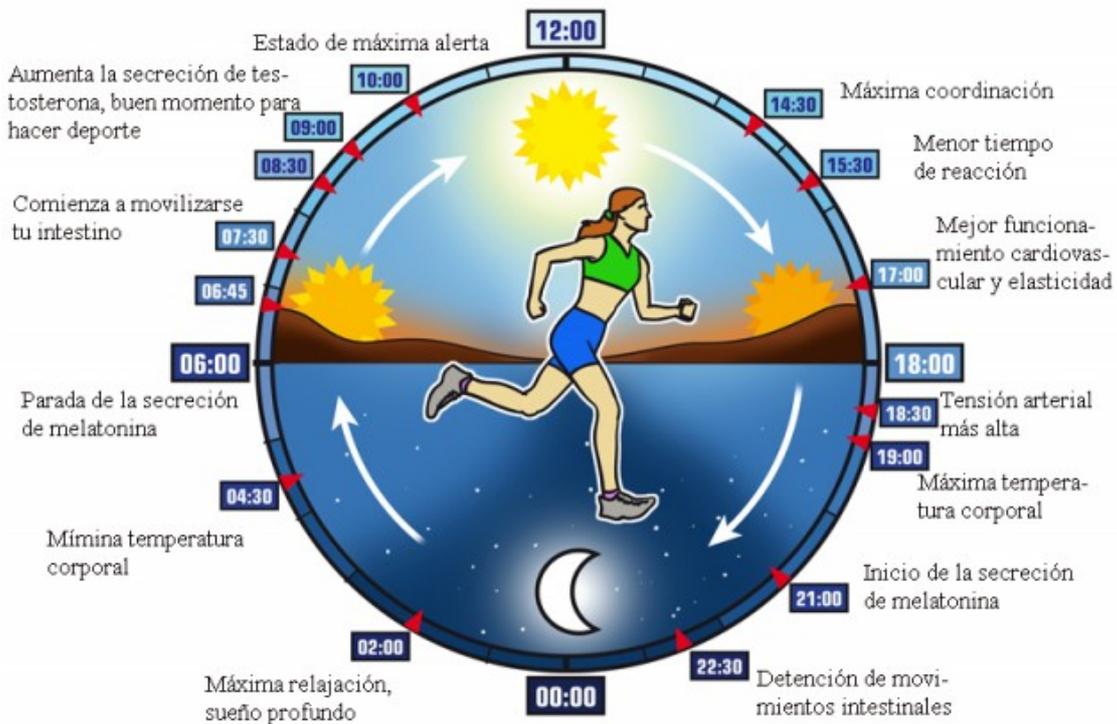


Figura 1: Variaciones diarias de algunas funciones fisiológicas (Imagen adaptada de M. Smolensky, *The body clock guide to better health*, 2000).

4.2 ¿DÓNDE ESTÁN?

En el ser humano existe un reloj interno central situado en los Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ), que consiste en un grupo de acúmulos de neuronas (cada una de ellas con su propio reloj interno) situadas en el hipotálamo, capaces de ejercer un control temporal de las funciones biológicas. Los ritmos sueño/vigilia, los cambios en niveles sanguíneos de las hormonas, la sensibilidad al dolor o incluso la capacidad intelectual, la habilidad manual o la fuerza física varían a lo largo del ciclo diario (3).

Este NSQ es considerado el “oscilador endógeno”, “marcapasos” o “reloj interno propiamente dicho”, y sabemos esto gracias a que, en 1985, Fred Turek, un investigador de la *Northwestern University* (Illinois, USA), demostró que extirpando quirúrgicamente los núcleos supraquiasmáticos cesaba la actividad rítmica de los ratones; mientras que al trasplantarlos a animales arrítmicos por carecer de NSQ, éstos recuperaban la ritmicidad propia de los NSQ del donante (4).

Como ya hemos mencionado anteriormente, no solo el NSQ tiene ritmicidad, si no que todas y cada una de las neuronas que lo constituyen tienen su propio “reloj interno”, y

más aún, no solo eso, si no que estos genes reloj se expresan en todas las células del organismo (3).

Esto inicialmente puede entenderse como una anarquía de relojes ya que, si cada célula marcara su propio ritmo, guiada por su reloj particular, el organismo sería un caos funcional. Pero esto no ocurre ya que existe una relación jerárquica entre el reloj que configura el NSQ o central, y los relojes de cada órgano, o periféricos. Solo los NSQ reciben información directa de lo que está pasando en el exterior, ya que solo ellos tienen conexión con el medio ambiente a través de la luz que llega a los ojos, y detectan la alternancia luz/oscuridad. Los relojes periféricos no disponen de esta información, sino que la reciben del reloj central, de tal manera que son coordinados por éste, como describiremos a continuación (3).

4.3 ¿CÓMO FUNCIONAN?

4.3.1 Núcleo Supraquiasmático

En el ser humano, los NSQ no marcan días de 24 horas, si no que los marcan de unas 25 horas y va a ser la luz ambiental el principal agente encargado de sincronizar nuestro reloj biológico con la duración del día. Entonces, ¿qué ocurriría en ausencia de luz? Hemos dicho que los NSQ tienen un ciclo de unas 25 horas; por lo tanto, si una persona se encerrara sin luz una temporada, acabaría teniendo días de 25 horas, ya que la luz no podría ajustar esa hora de exceso (5).

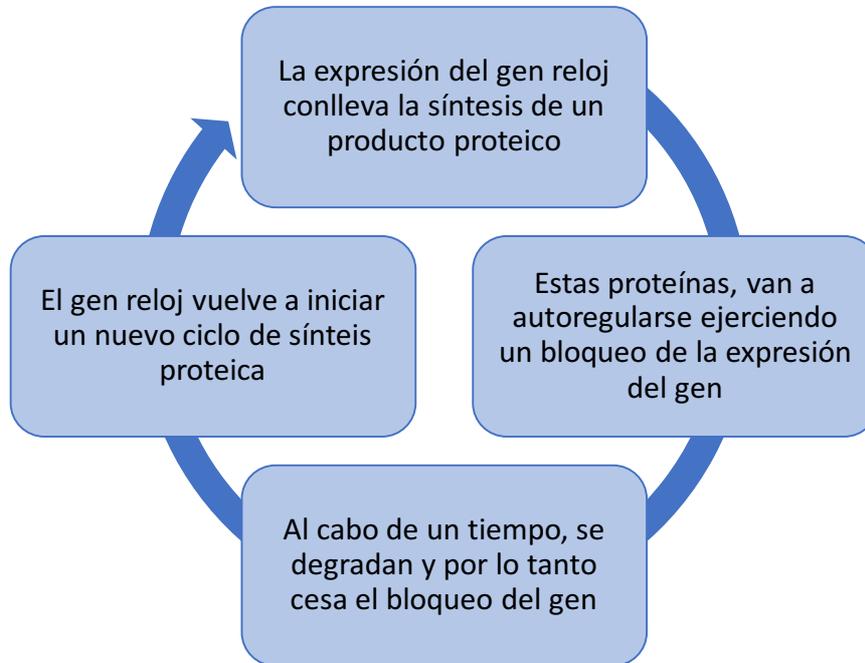
Pero como hemos dicho antes, la luz es el principal sincronizador, pero no el único. En condiciones en las que la luz no puede actuar como sincronizador principal (como en sujetos con ceguera total) serán otras señales rítmicas, estables y potentes, las encargadas de sincronizar nuestro reloj interno como puede ser la comida o la actividad física las que regulen los NSQ (5).

Volviendo a la luz, ya que es el principal y más importante agente sincronizador, ¿cómo llegan las señales luminosas hasta nuestro reloj biológico? La luz entra a través de los ojos y es percibida por los conos y los bastones, pero también por un tipo celular denominado: *células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles*. Estas últimas contienen el fotopigmento llamado *melanopsina*, e integran la señal de luz recibida de dos formas diferentes: directamente, gracias a su fotosensibilidad intrínseca; y por una conexión sináptica (vía aferente) desde los conos y los bastones. Las proyecciones neuronales dependientes de la melanopsina conectan la retina con áreas cerebrales profundas, como el núcleo de la oliva pretectal, la glándula pineal y tálamo entre otros (5).

4.3.2 Relojes celulares

A día de hoy sigue habiendo pequeñas lagunas en la comprensión de este mecanismo funcional. En el núcleo de las “células reloj” se expresan cíclicamente diferentes genes reloj. Como ya sabemos, estos genes se identificaron primero en la mosca del vinagre,

posteriormente en ratones y más tarde ya en el hombre. De una manera muy sucinta se podría decir que estos genes controlan la síntesis de unas proteínas que tienen la propiedad de bloquear su propia síntesis. Cuando estas proteínas son destruidas, cesa el autobloqueo y comienzan a ser sintetizadas de nuevo, y así de forma cíclica. La secuencia de eventos sería la siguiente: (6)



Este es un campo de investigación muy explotado actualmente ya que cada vez se identifican más genes reloj, y por lo tanto cada vez se está más cerca de conocer con exactitud la forma en la que estos genes provocan la ritmicidad intrínseca de las células.

4.4 ¿QUÉ PASA DURANTE LA NOCHE?

Hasta ahora hemos descrito cómo la luz diurna es capaz de regular los relojes biológicos, pero durante la noche no hay luz que pueda regular. Para entender mejor lo que sucede en oscuridad tenemos que introducir la melatonina, una hormona que se sintetiza fundamentalmente en una glándula ubicada en el cerebro, la glándula pineal, que es un órgano que, en respuesta a los cambios de luminosidad medioambiental, detectados por la retina y transmitidos hasta ella por una compleja vía nerviosa, genera una señal química, la melatonina, que circula por el cuerpo a través de la sangre, llegando a todas las células del organismo. Por lo tanto, esta hormona se va a sintetizar únicamente en oscuridad ya que, en presencia de luz, esta vía está bloqueada (7).

Por lo tanto, la melatonina va a ser la encargada de informar a todas las células de cuando se hace de noche. De la misma manera, la ausencia de melatonina informa de cuando es de día (7).

En un sujeto sano, cualquier exposición a un estímulo luminoso lo suficientemente intenso, aunque sea breve, va a suprimir de inmediato la producción de melatonina tal y como se ejemplifica en la figura 2. Las fuentes de luz natural, como puede ser la luna

o los sistemas de iluminación artificial no eléctricos no llegan a suprimir la producción de melatonina. Sin embargo, la luz artificial eléctrica, que usamos desde hace apenas 100 años, sí que puede tener intensidad suficiente para afectar la actividad de nuestra glándula pineal e inhibir completamente la síntesis nocturna de melatonina (5).

En el apartado siguiente, describiremos las funciones de la melatonina en condiciones de salud y su papel en algunas patologías.

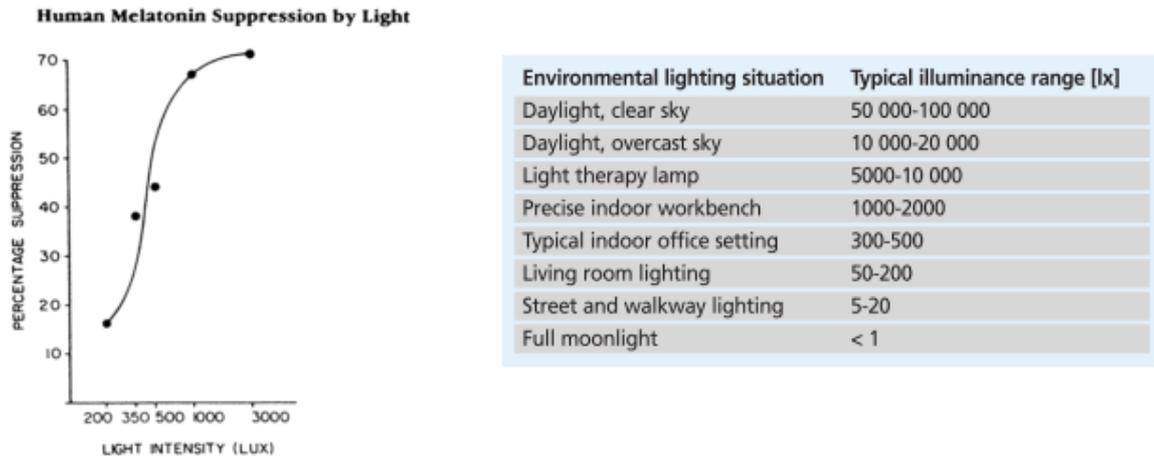


Figura 2: Gráfica que nos muestra la curva del porcentaje de supresión de melatonina (ordenadas) frente a la intensidad de luz (abscisas). Al lado, una tabla que nos asocia situación de la vida cotidiana con la intensidad de luz a la que nos expone. Podemos observar como situaciones a la que todo el mundo se expone, como puede ser estar en el salón iluminado puede suprimir la producción de melatonina (Tomado de M.M. Machi et al, Human pineal physiology and functional significance of melatonin, 2004).

4.4.1 Funciones de la melatonina

La melatonina se encuentra en todos los seres vivos de los reinos vegetales y animales. Este hecho hace pensar que sus funciones puedan ser múltiples y distintas dependiendo del organismo. Una de las acciones mejor caracterizadas es la acción antioxidante.

Debido al propio metabolismo y a la acción de factores ambientales, como la radiación, se generan en nuestro organismo compuestos químicos muy inestables llamados “radicales libres”. Estos compuestos son altamente reactivos y causan lesiones en el material genético, por lo que se les ha considerado como posibles causantes del cáncer y de procesos de envejecimiento. Una posible explicación a la necesidad de una mayor acción antioxidante durante la noche es que se ha demostrado que durante el sueño, nuestro organismo experimenta una mayor tasa de renovación celular, de tal manera que la presencia de niveles circulantes de melatonina superiores a los del día sería una forma de proteger el material genético de posibles daños por agentes oxidantes (7).

Otra de las funciones de la melatonina es, como ya hemos citado, es el control de la alternancia vigilia/sueño, siendo por ello una señal de que ya no hay luz en el exterior. Se ha demostrado que es la causante de la modulación fisiológica que experimentamos al inicio del sueño, como es el descenso de la temperatura corporal. Gracias a su efecto

inductor del sueño demostrado, podemos encontrar una variedad de fármacos cuya fórmula molecular es muy semejante a la de la melatonina (7).

Para terminar con las funciones más importantes de la melatonina en el ser humano, vamos a hablar de sus posibles efectos antiestrogénicos, esto es, un control restrictivo de la síntesis y las acciones de las hormonas estrogénicas. En niños con tumores cerebrales que destruyen la glándula pineal, se puede apreciar un desarrollo sexual precoz. También en mujeres con amenorrea se han apreciado concentraciones elevadas de melatonina en sangre, que podrían ser las responsables de la inhibición de su función ovárica. Estos hechos, ponen de manifiesto la acción inhibitoria de la melatonina sobre la reproducción sexual, provocando, en caso de su defecto desarrollo sexual precoz, y por lo contrario en caso del aumento de su concentración sanguínea en la mujer, cese del ciclo menstrual (7).

Además, se ha demostrado que, en la mujer, a lo largo del ciclo menstrual, los niveles de melatonina van a fluctuar, siendo mínimos en la ovulación. Esto ha sido la base para justificar su posible relación con la etiología de algunos tipos de tumores mamarios, particularmente aquellos cuyo desarrollo dependen de hormonas ováricas (7).

4.4.2 Papel de la melatonina en el cáncer

La melatonina tiene un papel protector en el cáncer, inhibiendo los procesos de inicio, progresión e incluso a nivel de metástasis (esto último especialmente importante en el cáncer de mama, ya que es la causa de muerte en estas pacientes). Además, se ha demostrado que tiene la capacidad de reducir las consecuencias tóxicas de los agentes quimioterapéuticos a la vez que incrementa su eficacia (8).

En el inicio del proceso cancerígeno, sustancias con alto poder oxidante, como pueden ser por ejemplo los productos de agentes ionizantes, crean inestabilidad en el ADN de las células, lo que puede desembocar en mutaciones iniciadoras del cáncer. Se ha descrito que la melatonina es un neutralizador del radical hidroxilo, responsable de cerca del 70% del daño genómico en células expuestas a radiaciones de alta energía. Esto se demostró en un estudio en el que a voluntarios humanos se les administró melatonina de forma oral y se les extrajo linfocitos que fueron expuestos *ex vivo* a radiación ionizante. La frecuencia de daño cromosómico se redujo en un 60-65% en los linfocitos obtenidos de los individuos bajo tratamiento con melatonina frente a linfocitos extraídos durante el día de otros individuos que no recibieron este tratamiento (9).

En cuanto al papel que juega la melatonina en la progresión de las células cancerígenas, se ha visto que, mientras que en células normales la melatonina es capaz de neutralizar agentes oxidantes, en las células tumorales, por el contrario, estimula su producción. Esta sorprendente diferencia se explica por una diferencia de receptores y vías de señalización intracelular estimulados en ambos tipos de células. El acúmulo de estos agentes oxidantes se traduce en una inducción de la apoptosis. Por lo tanto puede inferirse que la melatonina podría mediar la muerte de las células cancerígenas conduciéndolas a la apoptosis (8).

No se quedan ahí las acciones de esta hormona con respecto al cáncer. Se ha demostrado en situaciones en las que hay contaminación lumínica durante la noche y también en individuos ancianos (que tienen niveles de melatonina reducidos) que el cáncer es frecuentemente más resistente a terapias hormonales. Incluso la interrupción nocturna de los niveles de melatonina en plasma conduce a una pérdida completa de respuesta tumoral a algunos tratamientos de quimioterapia, como la doxorubicina (8). Además, la coadministración de melatonina aumenta la sensibilidad del cáncer al efecto de los agentes quimioterapéuticos o bien la melatonina es capaz de hacer sensibles algunos cánceres que previamente eran resistentes al tratamiento (10,11).

Por último, señalar sus acciones a nivel de metástasis. Las metástasis son las responsables de la mayor parte de las muertes por procesos malignos. Es un proceso que requiere que las células cancerígenas se escapen del tumor primario, sobrevivan a su transporte en la sangre, y puedan anclarse y proliferar en algún punto distante. La melatonina es capaz de actuar tanto a nivel celular, como modificando el microambiente tumoral. Todo esto incluye la regulación de diferentes procesos como son: la relación célula-célula, célula-matriz, remodelado de la matriz celular, reorganización del citoesqueleto, transición epitelio-mesenquimal y angiogénesis (8).

En los últimos años, se ha demostrado el papel oncostático de la melatonina cuando es administrada junto a la quimioterapia en el tratamiento de algunos tipos de cáncer entre los que, además de los tumores dependientes de hormonas se encuentran el pancreático, de estómago, microcítico de pulmón, ovárico o leucemia (12).

Todo lo anteriormente mencionado apunta a que estamos ante una nueva función de la melatonina: hacer de moduladora entre el tratamiento quimioterapéutico y las células tumorales. Aún queda mucho por investigar, sobre todo a nivel molecular, para esclarecer cuales son los mecanismos en los cuales reside este efecto de la acción de esta hormona sintetizada en oscuridad.

5. LA LUZ COMO POTENCIAL CARCINÓGENO

La entrada de la luz eléctrica en la vida del ser humano es un hecho de indiscutible transcendencia ya que sería inviable pensar, ahora en pleno siglo XXI, en restringir el uso de los dispositivos electrónicos durante la noche, así como del alumbrado nocturno. Esto ha pasado a ser un componente inseparable de la vida desde que empezó su uso de forma masiva hará apenas un siglo, que, si tenemos en cuenta los 5 millones de años que llevan los homínidos poblando la Tierra, es muy poco tiempo. Esta ruptura del ciclo de penumbra cada 24 horas va a afectar a la fisiología del ser humano. De hecho, se han publicado muchos trabajos en los que se ha correlacionado la exposición a la luz nocturna con un incremento en la incidencia de algunos tipos de cáncer, por ejemplo, en gente especialmente expuesta a la luz durante la noche, como son los trabajadores de turnos nocturnos.

5.1 CÁNCER DE PRÓSTATA

Un estudio epidemiológico llevado a cabo sobre un grupo de 3.137 sujetos varones, ya diagnosticados de cáncer, y 512 controles, concluyó que, para determinados tipos de tumores como los de colon, próstata, tumores rectales, pancreáticos y linfomas no Hodgkin, los trabajadores nocturnos tienen casi el doble de riesgo que los trabajadores diurnos de padecerlos. En el caso concreto del cáncer de próstata, el riesgo es casi tres veces mayor (13).

En 2009, un grupo de investigadores israelíes y norteamericanos correlacionaron la incidencia de tres tipos de cáncer (próstata, pulmón y colon) en varones residentes en 164 países (incluida España), con el nivel de exposición a luz nocturna. Evaluaron los niveles de iluminación artificial de cada zona geográfica a partir de imágenes de satélite y calcularon la exposición a luz artificial por persona y noche. Lo que observaron fue una correlación positiva entre la exposición a luz nocturna y la incidencia del cáncer de próstata, pero no con respecto a los tumores de pulmón y colon. En los países con mayor exposición a luz nocturna, la incidencia de cáncer de próstata era un 110% superior a la de los países con menores niveles de iluminación durante las noches (14).

Como ya hemos dicho, la disrupción circadiana del ciclo luz-oscuridad ocasiona una supresión de la secreción nocturna de melatonina. Ésta, parece disminuir la actividad endocrina de las gónadas, es decir reduce la producción de andrógenos en el hombre y de estrógenos en la mujer. Algunos tipos de tumores, como es el caso de muchos de los de próstata o mama, reciben el adjetivo de “hormono-dependientes” porque su progresión depende de los niveles sanguíneos de determinadas hormonas. El cáncer de próstata crece en respuesta a las hormonas gonadales masculinas (andrógenos, como la testosterona). Así una de las estrategias para su tratamiento es el bloqueo de las acciones de los andrógenos con los fármacos apropiados (15).

Así pues, en el caso del cáncer de próstata, la hipótesis propuesta es: la luz nocturna bloquea la síntesis de melatonina lo que implica un menor “freno” sobre la actividad de los andrógenos (testosterona); el aumento relativo de la actividad androgénica favorece el crecimiento de las células tumorales prostáticas (15). En efecto, estudios *in vitro* con células tumorales han demostrado que la melatonina es capaz de inhibir su proliferación. *In vivo*, en ratones xenotransplantados con células de cáncer de próstata, la supresión de la melatonina ya sea por exposición a luz nocturna o bien por la extirpación de la glándula pineal acelera el crecimiento tumoral (8).

Se ha demostrado que los pacientes con cáncer de próstata tienen niveles de melatonina en sangre más bajos que los de personas sanas o que padecen tumores benignos. La concentración de la melatonina está inversamente relacionada con la progresión del cáncer de próstata. Por lo tanto, la melatonina tiene un papel central reprimiendo la progresión del cáncer de próstata, y parece ser un prometedor agente anticancerígeno, ejerciendo un efecto antiproliferativo tanto en células cancerígenas sensibles como en las resistentes a tratamiento mediante la inducción de la apoptosis y la parada del ciclo celular. Por último, la administración de melatonina parece limitar la microvascularización en el microambiente tumoral, lo que también interfiere en el proceso de angiogénesis, el factor más importante en la progresión tumoral (8).

5.2 CÁNCER DE MAMA

Los tumores mamarios son los más frecuentes en las mujeres occidentales. En España, según datos de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), se diagnostican unos 26.000 casos nuevos de cáncer de mama al año, lo que representa el 30% de todos los tumores femeninos y supone la primera causa de mortalidad por cáncer en mujeres, con 6.075 fallecimientos en 2012. Este tipo de tumores ha sido el más estudiado en cuanto a la posible relación cáncer-luz nocturna. El riesgo de padecer cáncer mamario es alrededor de cinco veces mayor en los países industrializados que en los subdesarrollados, y en estos últimos aumenta con el nivel de desarrollo a medida que lo hace el consumo eléctrico y la exposición a luz artificial tanto en los lugares de trabajo como en los hogares (16).

Si la luz nocturna inhibe la secreción de melatonina y la melatonina ejerce algún tipo de protección frente al cáncer mamario, podemos deducir que la contaminación luminosa nocturna puede tener efectos negativos sobre nuestra salud, favoreciendo el desarrollo del cáncer mamario, al bloquear la liberación de melatonina. Como ya se ha descrito con anterioridad, entre las acciones de la melatonina está su capacidad para modular los efectos de los estrógenos. La hipótesis de partida, por tanto, es que las mujeres expuestas a la luz durante la noche producen menos melatonina, y como consecuencia, la capacidad de modular las acciones de los estrógenos. Esta propuesta se demostró en un estudio realizado en Boston (USA), en el que se comparó la concentración de 6-sulphatoxymelatonin (aMT6s) en la orina recogida durante la noche en mujeres con cáncer mamario y controles sanas. La aMT6s es un producto resultante del metabolismo de la melatonina en el hígado fácilmente cuantificable en el laboratorio, y sirve como una medida indirecta de la cantidad de esta hormona que ha sido secretada por la pineal. Los resultados de este trabajo demostraron que la excreción urinaria de aMT6s era mayor en las mujeres sanas que en las que padecían tumores mamarios, lo que indicaba una menor secreción de melatonina en estas últimas. De nuevo estamos ante la evidencia de una correlación entre bajas concentraciones de melatonina e incremento del cáncer mamario (17).

Estudios experimentales llevados a cabo bien con cultivo de células tumorales (estudios *in vitro*) o en ratas y ratones con tumores mamarios inducidos han demostrado que la melatonina, a concentraciones semejantes a las que se alcanzan durante la noche en la sangre humana, es capaz no solo de frenar el crecimiento (proliferación) de estas células, sino también de reducir su capacidad invasiva para producir metástasis. De los estudios de laboratorio se puede decir que la melatonina frena, al menos parcialmente, el crecimiento de los tumores mamarios, ya no solo aplicada en solitario, si no que en múltiples estudios en los que se ha comparado el tratamiento quimioterapéutico de cáncer de mama hormono dependiente más placebo, frente a otro grupo en el que el tratamiento se le añadía melatonina, se ha podido concluir que esta adyuvancia suponía una mejoría en el paciente, particularmente en cuanto a remisión tumoral, supervivencia a 1 año y reducción de los efectos secundarios de la quimioterapia. Entre éstos destaca la menor incidencia de trombocitopenia, estomatitis, astenia, neuropatía y toxicidad de progenitores hematopoyéticos (12).

Tal es la trascendencia que hay ya algunos estudios experimentales que avalan la hipótesis del posible papel de la polución luminosa en la carcinogénesis mamaria a

través de la supresión de la síntesis de melatonina. Uno de ellos, llevado a cabo en la Universidad de Cantabria, consistió en inducir tumores mamarios en ratas mediante la administración de un carcinógeno químico. Una vez que aparecían los tumores, parte de los animales, los que servían de control, fueron situados en una habitación iluminada de manera convencional durante 12 horas (simulando el día) y en oscuridad total durante las restantes 12 horas (simulando la noche). El resto de animales, en vez de disfrutar de oscuridad total durante la noche, fueron expuestos a luz nocturna. Al cabo de 12 semanas en estas condiciones, el crecimiento de los tumores fue significativamente mayor en los animales en los que no se respetó la oscuridad nocturna que en los controles. En los animales expuestos a contaminación luminosa nocturna, además de un mayor crecimiento tumoral, se observaron alteraciones del ritmo de secreción de melatonina (18).

Más recientemente, un grupo de científicos de la Universidad de Tulane (Louisiana, USA) encabezado por el profesor David Blask, xenotransplantó células de tumores mamarios en ratas. Una vez desarrollados los tumores, se hizo pasar a través de los vasos sanguíneos de los mismos, suero sanguíneo de mujeres obtenido durante el periodo de oscuridad nocturna. El resultado fue que el suero de estas mujeres disminuía el crecimiento tumoral. Sin embargo, cuando se utilizaba suero de las mismas mujeres, pero obtenido después de que hubieran sido expuestas a luz durante la noche, el efecto de disminución del crecimiento tumoral no se producía. La principal diferencia entre los sueros obtenidos en oscuridad o tras exposición a luz era el menor contenido de melatonina en estos últimos, lo que parece indicar que la inhibición de la síntesis de melatonina, por la cronodisrupción causada por la exposición a luz durante la noche, podría ser la causa de la pérdida de la capacidad antitumoral del suero (19).

En las personas que llevan a cabo su trabajo durante la noche se da la doble circunstancia de un desfase entre el reloj interno y las demandas de actividad, y la exposición a luz durante la noche. En 2007, la Agencia Internacional para la investigación del Cáncer, basándose en datos epidemiológicos y de experimentación animal, reclasificó el trabajo nocturno que implica disrupción circadiana de “posible” a “probable” carcinógeno humano (grupo 2). El trabajo nocturno altera el sistema circadiano, induce una privación crónica de sueño y suprime la secreción de melatonina.

En resumen, la interrupción de la secreción de la melatonina nocturna por la exposición a luz se sabe que se relaciona con un riesgo aumentado de cáncer. Cualquier alteración de este aumento de melatonina en sangre esta inevitablemente acompañado por una alteración general de los ritmos circadianos, que son el resultado de una función anómala de la actividad del reloj central, el núcleo supraquiasmático (NSQ). Dado que el NSQ influye en la organización del resto de relojes circadianos periféricos, la luz nocturna también alterará estos otros. Por lo tanto, no es siempre posible saber si el incremento de la incidencia de cáncer que se observa en el ser humano actual, que vive en un ambiente iluminado artificialmente durante la noche es el resultado de la supresión de la melatonina o debido a una cronodisrupción (debido a la expresión de *Per1* y *Per2*, supresores tumorales).

6. GENES RELOJ

Hasta ahora hemos establecido un *background* para comprender mejor el escenario en el que nos vamos a mover para hablar de los “genes reloj” es decir, los genes encargados del funcionamiento de los relojes biológicos. En la actualidad se siguen identificando cada vez más, pero podríamos decir que podemos encontrar en la literatura hasta 12 de estos genes con cierta investigación específica de cada uno de ellos:

- CLOCK (*clock circadian regulator*).
- CSNK1E (*casein kinase I epsilon*).
- CRY1 (*cryptochrome circadian clock 1*).
- CRY2 (*cryptochrome circadian clock 2*).
- PER1 (*period circadian clock 1*).
- PER2 (*period circadian clock 2*).
- PER3 (*period circadian clock 3*).
- NPAS2 (*neuronal PAS domain protein 2*).
- ARNTL/BMAL1 (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like/brain and muscle Arnt-like protein-1*).
- RORA (*RAR related orphan receptor A*)
- RORB (*RAR related orphan receptor B*)
- NR1D1 (*nuclear receptor subfamily 1 group D member 1, también conocido como Rev-Erb alpha*)
- NR1D2 (*nuclear receptor subfamily 1 group D member 2, también conocido como Rev-Erb beta*).

Otro gen relacionado es TIMELESS (*timeless circadian clock*), aunque aún no se sabe muy bien su papel en los mamíferos (20).

Recordemos que estos genes no son exclusivos de las neuronas del NSQ, sino que están presentes en la práctica totalidad de las células del organismo. Por eso hablábamos de la existencia de un reloj central (NSQ) y de relojes periféricos (los situados en las células de cada órgano).

6.1 FUNCIONAMIENTO

6.1.1 Mecanismo molecular de los relojes circadianos

El mecanismo molecular de los relojes en los mamíferos, actualmente se basa en la existencia de dos bucles transcripcionales (uno positivo y otro negativo) de retroalimentación en los que participan al menos 10 de los genes enumerados anteriormente. Los genes *Clock* y *Bmal1* codifican para unas proteínas que forman el bucle de retroalimentación positiva. El heterodímero CLOCK:BMAL1 inicia la transcripción uniéndose a elementos específicos del ADN, E-boxes y E'-boxes en los promotores de genes diana. Estos genes incluyen miembros del bucle de retroalimentación negativa como *Per* (*Per1* y *Per2*) y *Cry* (*Cry1* y *Cry2*). Las proteínas resultantes PER y CRY dimerizan e inhiben la actividad transcripcional de CLOCK:BMAL1 permitiendo así que el ciclo empiece de nuevo partiendo de un nivel de baja transcripción, tal y como se pretende ilustrar en la figura 3. El remodelado de la

cromatina necesario para esta actividad transcripcional cíclica se consigue por una combinación de proteínas reloj específicas e histonas, y puede observarse en la acetilación/deacetilación rítmica de las histonas (H3 y H4) y múltiples genes reloj. Cabe resaltar que la proteína CLOCK posee un dominio histona acetil transferasa (HAT) (21).

La deacetilación ocurre, en parte, gracias al reclutamiento por parte de PER1 del complejo SIN3 histona deacetilasa al complejo CLOCK:BMAL1 unido al ADN. La deacetilación de la histona H3 en los promotores de los genes reloj está regulada por SIRT1, que es sensible a NAD^+ . Este dato es interesante pues es un hecho que la proporción $NAD^+ : NADH$ regula la afinidad con la que CLOCK:BMAL1 se une al ADN in vitro. Por lo tanto, el metabolismo celular podría jugar un papel importante en la transcripción de los genes reloj (21).

La degradación de las proteínas del bucle negativo PER y CRY es necesaria para comenzar de nuevo el ciclo de transcripción, así mismo el índice estabilidad/degradación de PER y CRY es clave para regular el ciclo circadiano del reloj (21).

Los miembros del bucle negativo, en particular las proteínas codificadas por los genes PER, actúan como la variable estabilizadora en el mecanismo. Quiere decir que los niveles de estas proteínas determinan la fase del reloj. Durante la noche, cuando los niveles de PER son bajos, una dosis de luz es suficiente para inducir la transcripción de *Per1* y *Per2*. Con la exposición a la luz en la primera parte de la noche, se observa un comportamiento de retraso del ciclo, y esto se corresponde al aumento de las proteínas PER1 y PER2 inducidas por la luz y observadas en el SNC. La exposición a la luz al final de la noche solo eleva los niveles de PER1, lo que se vincula a un avance del ciclo. Este retraso en el comportamiento cuando la luz está presente en la primera parte de la noche, y el avance que experimenta cuando está presente al final de la noche es suficiente para entrenar a un animal a un ciclo luz-oscuridad concreto (21).

El dímero CLOCK:BMAL1 inicia también la transcripción de un segundo bucle que actúa en coordinación con el ya descrito. Interviene la transcripción mediada a través de elementos E-box de *Rev-Erb alpha/beta* y ROR alpha/beta. Las proteínas REV-ERB y ROR se unen a elementos de respuesta "Retinoic acid-related Orphan receptor Response Element" (RORE) en el promotor de *Bmal1*, de manera que ROR actúa iniciando la transcripción de *Bmal1* y REV-ERB lo inhibe. Este bucle fue inicialmente descrito como bucle accesorio a partir de los fenotipos caracterizados en ratones sin un alelo de uno de estos genes. Mientras que un doble knock-out tradicional es letal durante el desarrollo, las estrategias para inducir un doble knock-out han permitido la delección de *Rev-Erb alpha/beta* en un animal adulto. Esto ha revelado que *Rev-Erbs* son necesarios para la regulación normal periódica del comportamiento de la ritmicidad circadiana (21).

Por último, los genes de la familia HLF, DBP, TEF y Nfil3 conforman otro conjunto de genes que contienen elementos D-box en su promotor y que constituyen otro bucle de transcripción (21).

Si consideramos la proporción entre transcripción/ traducción y el bucle de transcripción iniciado a partir de elementos E-box descrito para los genes *Per/Cry*, es fácil pensar que el ciclo completo dura significativamente (incluso algunas horas) menos de 1 día. Por eso se ha propuesto que los tres elementos de unión juntos aportan ese

retraso al ciclo para que dure 24 horas: E-box por la mañana, D-box durante el día, y los RORE por la tarde (21).

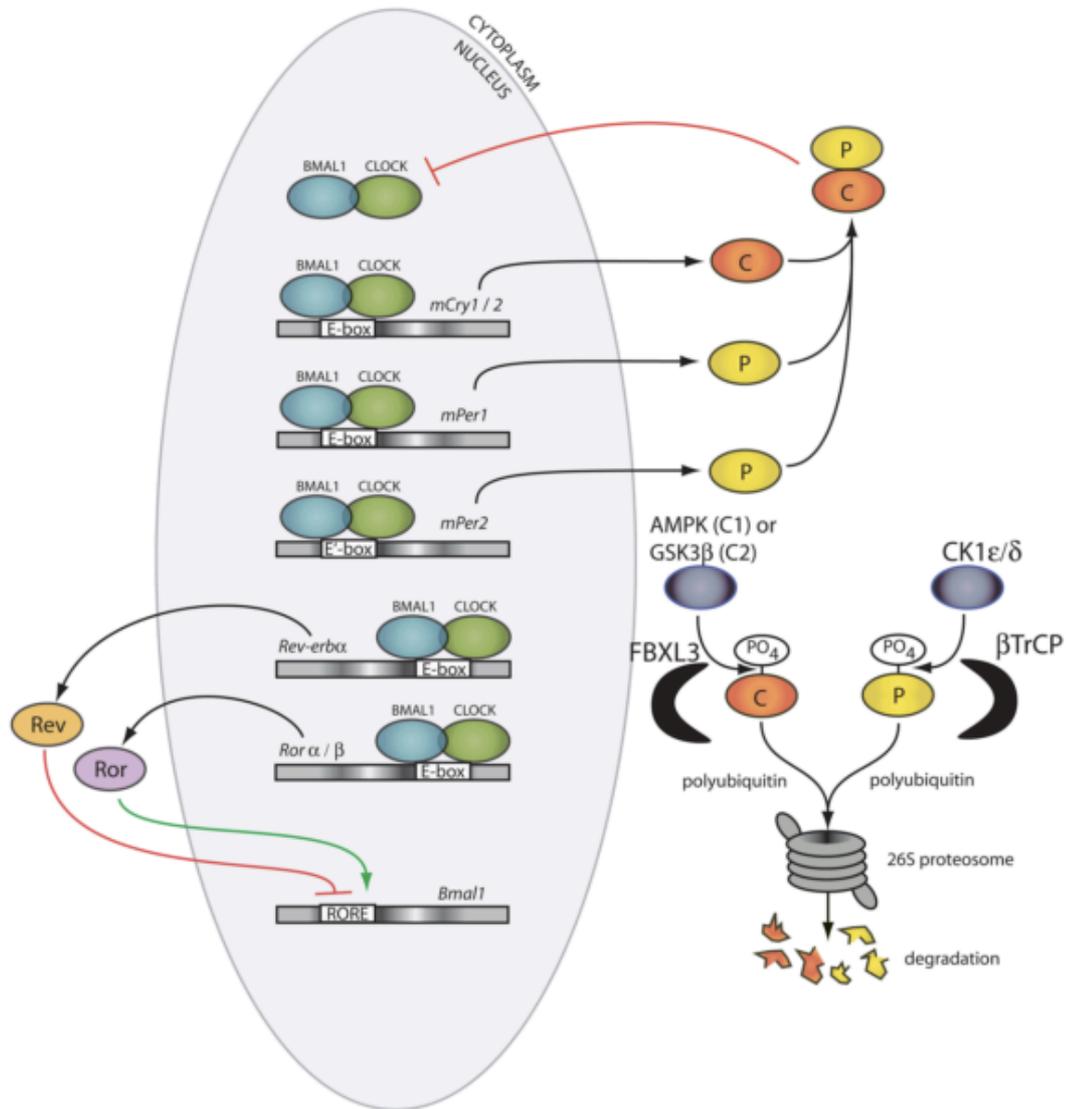


Figura 3: Esquema molecular del reloj de los mamíferos. Los heterodímeros CLOCK:BMAL1 (óvalos verdes y azules) se unen al ADN de los genes diana en los E-boxes y E'-boxes e inician la transcripción de su ARN. Las proteínas PER y CRY resultantes (óvalos rojos y amarillos) dimerizan en el citoplasma y se traslocan al núcleo donde inhiben a las proteínas CLOCK:BMAL1 (Imagen tomada de E. D. Buhr et al, Molecular components of the mammalian circadian clock, 2013).

6.1.2 Relojes periféricos

Todo el circuito transcripcional ya descrito no sólo se puede observar en el SNC, si no que aparece en casi todos los tejidos de los mamíferos. A nivel celular, se produce también todo el trabajo molecular de los genes reloj. Por lo tanto aparte de los genes reloj centrales, cientos o incluso miles de genes se expresan con ritmo circadiano en los tejidos, pero esto no quiere decir que haya cientos de genes reloj (21).

Vamos a imaginar que los genes reloj funcionan como los engranajes de un reloj de verdad que tiene cientos de manillas apuntando en distintas direcciones pero que se mueven en sincronía. Varias vías de señalización celulares y la expresión coordinada de familias de genes se encargan de que las manillas estén en su correcta fase para su función aislada e individual. Por lo tanto, comparten el mismo componente de genes reloj (engranajes) que activan los distintos mensajeros (manillas del reloj) que varían dependiendo del tipo celular (21).

La extensión total de la transcripción en una sola célula controlada por ritmos circadianos no era valorable hasta que aparecieron las herramientas genómicas. Entre un 2% y un 10% del genoma total se transcribe de forma circadiana en bastantes tejidos de ratón. En un estudio en el que se comparó el perfil de expresión de cerca de 10.000 genes en SNC y en el hígado, se obtuvo que 337 eran cíclicos en el SNC y 335 en el hígado; curiosamente, sólo 28 de esos genes se solapaban en ambos tejidos (22). Cada vez se encuentran más genes con expresión circadiana como demuestra otro trabajo en el que apunta varios miles de transcritos cíclicos en el hígado (23). La expresión circadiana de genes en cada tejido es específico y se optimiza para adaptarse de la mejor forma a la función del respectivo tejido a lo largo del ritmo circadiano (21).

Los genes controlados de forma circadiana están involucrados en distintas vías de señalización dependiendo del tejido. En la retina, por ejemplo, cerca de 300 genes muestran expresión rítmica en la oscuridad, y esto incluye genes involucrados en fotorrecepción, transmisión sináptica, y metabolismo celular. El número de genes que parecen ser activados por la luz llega a la cifra de unos 2.600 genes en presencia de un ciclo luz-oscuridad. Es importante destacar que toda esta organización transcripcional se pierde en ausencia del gen reloj *Bmal1*. En un creativo ejemplo de la expresión condicional de transgenes, Ueli Schibler et al suprimieron la expresión de CLOCK:BMAL1 exclusivamente en el hígado. Sorprendentemente 31 genes seguían transcribiendo rítmicamente, presumiblemente usando señal sistémicas del resto del organismo (24).

Es probable que, así como algunos osciladores periféricos han afinado sus transcriptomas circadianos, también usen señales de fase fisiológicas únicas para sincronizarse con el SNC. Tiene que haber vías de señalización que sean suficientes para ajustar la fase de la mayoría de los tejidos. Por ejemplo, las fluctuaciones fisiológicas de temperatura pueden sincronizar gradualmente muchos osciladores periféricos. Así la luz sincroniza el SNC con el exterior y el SNC controla la fluctuación circadiana de la temperatura corporal. Por lo tanto, esta señal externa que llega al SNC sirve como señal interna para los relojes circadianos de los tejidos periféricos, cuyas señales de activación son precisamente estas vías fisiológicas y ciclos transcripcionales locales de las células de todo el cuerpo. Profundizando aún más, parece ser que el SNC es resistente a los cambios fisiológicos en la temperatura corporal. Esto podría ser un hecho de importancia ya que la fase del SNC no es influenciada por el propio parámetro que él mismo controla (21).

Existen más diferencias entre el reloj central y el de los tejidos periféricos a nivel molecular. El gen *Clock* fue descubierto como una mutación que implicaba que los ritmos a nivel molecular en el SNC fueran extremadamente largos y terminarían siendo arrítmicos. Sin embargo, si eliminamos un alelo de *Clock*, el SNC y el comportamiento del animal se mantienen perfectamente rítmicos. Esto se debe a que el gen *Npas2* actúa

como sustituto de *Clock* y lo compensa como compañero transcripcional de *Bmal1*. Este papel compensador de *Npas2* sólo funciona en el SNC, ya que la pérdida de *Clock* anula la ritmicidad circadiana de los osciladores moleculares en los relojes periféricos (21).

Claramente, existen diferencias entre los relojes centrales y los periféricos a nivel del circuito transcripcional y en las comunicaciones intracelulares. El SNC se mantiene fuertemente rítmico en caso de pérdida de cualquier elemento, individualmente, del bucle de retroalimentación negativo del ciclo transcripcional. El ritmo de los relojes periféricos se mantiene cuando falta *Cry2*; sin embargo, el ritmo circadiano se pierde cuando en los tejidos periféricos falta *Cry1*, *Per1* o *Per2*. La importancia de *Per1* es considerable en cuanto al efecto en el comportamiento. Aunque la ausencia conjunta de *Per1* y *Cry1* (dos elementos necesarios en el bucle negativo de los tejidos periféricos y células por individual) da lugar a animales con ciclos normales (21).

Resumiendo, el funcionamiento se basa en dos circuitos de retroalimentación con una unidad de activación (CLOCK, NPAS2 y ARNTL (BMAL1)) y otra de supresión (PER y CRY). El complejo formado por el heterodímero compuesto por ARNTL unido a CLOCK o a NPAS2, activa la transcripción de los genes *PERs* (*PER1*, *PER2* y *PER3*) y *CRYs* (*CRY1* y *CRY2*). En cambio, los productos de estos genes inhiben su propia transcripción actuando directamente a nivel del complejo ARNTL-CLOCK/NPAS2 (25).

Este complejo también activa un segundo circuito regulador que activa la transcripción de *NR1D1*, *NR1D2*, *RORA* y *RORB*. *RORA* activa la transcripción de *ARNTL*, mientras que *NR1D1/D2* bloquean la transcripción de *ARNTL* (25).

TIMELESS, que forma parte de una familia de genes evolutivamente muy conservada, interviene en la ritmicidad circadiana interactuando directamente con *CRYs* e inhibiendo a *CLOCK*, pero esto está demostrado sólo en *Drosophila*. En los mamíferos al parecer estas funciones ya se encargan de realizarlas las propias proteínas *CRY*, y queda un poco en el aire qué tipo de función puede desempeñar *TIMELESS* en la regulación del reloj biológico (26). Sí se sabe que *TIMELESS* participa en el desarrollo embrionario, la progresión del ciclo celular, replicación del ADN y respuesta a daño en el ADN (20).

Pese al notable avance en el conocimiento de estas complejas rutas de funcionamiento del reloj biológico, aún queda mucho por aclarar y es un campo que actualmente está siendo muy investigado (25).

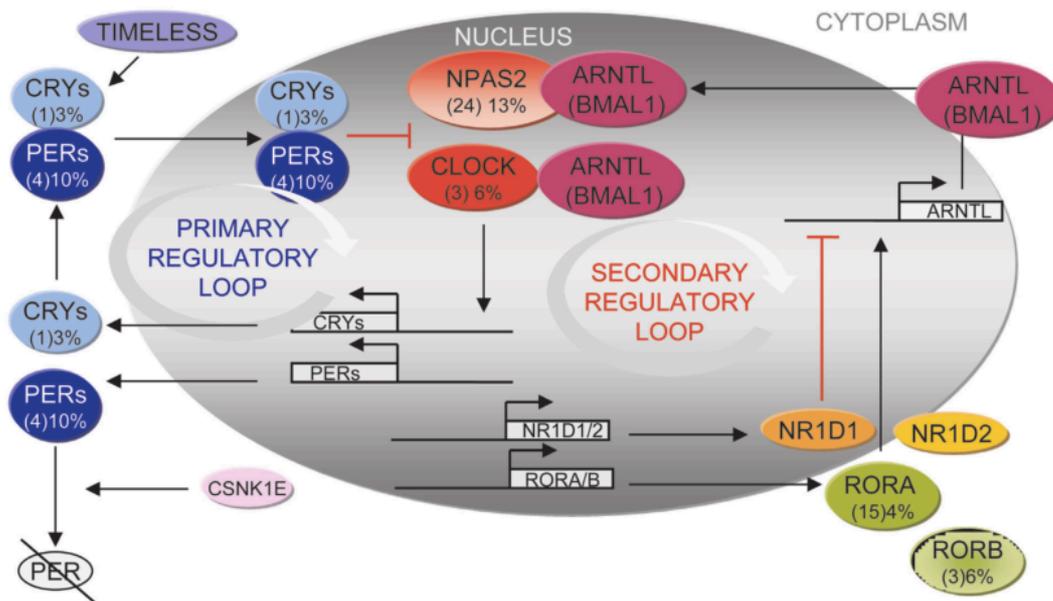


Figura 4: Imagen recogida de un Metanálisis publicado en 2017 por Benna C et al, en el que se pretende reflejar el hipotético mecanismo de acción del reloj celular en los mamíferos. Bucle regulador primario: la transcripción de los genes PER y CRY se activa mediante heterodímeros compuestos por ARNTL (BMAL1) y CLOCK o NPAS2. PERs y CRYs reprimen su propia transcripción al actuar directamente sobre el complejo ARNTL (BMAL1)-CLOCK/NPAS2. Las proteínas PER interactúan con las proteínas CRY para formar un complejo proteico. Tanto CRY como PER son fosforilados por quinasas, como CSNK1E, que desencadena su degradación si no están heterodimerizados. Bucle regulador secundario: los heterodímeros ARNTL (BMAL1)-CLOCK/NPAS2 activan la transcripción de NR1D1, NR1D2, RORA y RORB. RORA activa la transcripción de ARNTL, mientras que NR1D1 y NR1D2 lo reprimen. TIMELESS interactúa directamente con CRY1. Para cada gen se indica el porcentaje de SNP asociados con el riesgo de cáncer a partir del metanálisis realizados. Parentesis: número de SNP asociados con el riesgo de cáncer.

7. PAPEL DE LOS GENES RELOJ EN EL CÁNCER

Pese a estar muy bien conservados a lo largo de la evolución, los genes reloj no están exentos de las posibles variedades de polimorfismos que puede sufrir cualquier gen. El estudio de la posible relación entre alteraciones en los genes reloj y el riesgo de sufrir cáncer es muy reciente y no hay una gran batería de estudios que nos permita establecer una relación a ciencia cierta. Pese a esto, ya hay estudios que parecen demostrar esta relación. En concreto, los genes que más contribuyen, en general, a la asociación con mayor riesgo de cáncer son *Clock*, *Npas2* y *RORs* (20).

Algunos de los genes regulados por los genes reloj desempeñan funciones biológicas cuya alteración puede ser de relevancia para la carcinogénesis tales como son el control del ciclo celular, la respuesta al daño en el ADN, el remodelado de la cromatina o el control del metabolismo. Por lo tanto, podemos hablar de distinta susceptibilidad al desarrollo de cáncer dependiendo de la variante del gen en nuestros alelos (20).

Npas2 y *Clock* comparten cierta homología en la secuencia de aminoácidos, lo que les permite heterodimerizar con ARNTL y funcionar como un activador transcripcional regulando el ritmo circadiano. Se ha demostrado que algunas variantes de *Npas2* y *Clock* están frecuentemente asociadas al riesgo de cáncer, mientras que ARNTL no (20), con alguna excepción: se ha demostrado una alta asociación de una variante de ARNTL y el riesgo de cáncer de ovario (27). Las proteínas *ROR* también son factores transcripcionales que comparten alta homología, cuya asociación al riesgo incrementado de cáncer también ha sido estudiada, así como la rama inhibidora del ciclo (*Per* y *Cry*) de los relojes biológicos demostrando cierta correlación con el riesgo de cáncer, aunque se hace mucho más patente en la rama activadora que en esta última (20).

Aun así, no dejan de ser variantes de un mismo gen que indican mayor o menor susceptibilidad al riesgo de cáncer por desincronización de los relojes biológicos. Por lo tanto, se cree que una disrupción circadiana *per se* no debería ser un factor desencadenante de tumor y que el mecanismo para esto debido a alteraciones en los relojes biológicos será diferente dependiendo de los genes y los mecanismos involucrados. Por supuesto será mayor el riesgo ante una cronodisrupción el tener un apotipo de riesgo que no tenerlo. Por ejemplo, mutaciones en los genes reloj *Per* son promotores del crecimiento tumoral por un mecanismo de aumento de β -catenina y su señalización, que facilitan la proliferación celular. Los tumores intestinales también pueden alterar las proteínas PERs y el funcionamiento del reloj como resultado del aumento de la vía de señalización de las β -cateninas provocando la desestabilización de PER2. Hay estudios que avalan al gen reloj *Per2* como un supresor tumoral. Este efecto de pérdida de las proteínas PERs puede verse en los distintos cánceres epiteliales o escamosos. Por lo tanto, esto nos abre nuevas dianas para la prevención y control del cáncer (28).

7.1 Funcionamiento normal de los genes reloj

Antes de describir lo que se conoce con respecto a las alteraciones que se producen en la regulación de los genes reloj en las células cancerígenas, vamos a hacer una recapitulación del funcionamiento normal de este sistema. Los ritmos circadianos se generan gracias a un conjunto de genes y proteínas que se encargan de regular funciones muy diversas. Cada célula, incluso las cancerígenas mantienen un ritmo circadiano expresando genes reloj de forma parecida.

Los relojes moleculares en los tejidos periféricos regulan la expresión de genes y la síntesis de productos como timidilato sintetasa, p21, y Wee-1, que controlan la síntesis de ADN, el ciclo de división y proliferación celular, coordinando procesos fisiológicos de una forma circadiana (29).

La sincronización de los relojes circadianos se establece de una forma autónoma por moléculas cuyos niveles oscilan a lo largo del día por la existencia de dos bucles de transcripción/traslación de retroalimentación positiva y negativa entrelazados en el SNC y en los tejidos periféricos. Los genes humanos *period* (*Per1*, *Per2* y *Per3*) y *criptocromo* (*Cry1* y *Cry2*) son componentes del mecanismo del reloj central del SNC. Las proteínas producidas por estos genes (PER y CRY) inhiben a los activadores de su propia

transcripción: CLOCK y BMAL1 (30). A su vez, CLOCK y BMAL1 forman un heterodímero que participa en la inducción rápida de *mPer1* durante la fase de reseteo del reloj. CLOCK y BMAL1 son activadores transcripcionales heterodiméricos con dos subunidades proteicas con dominios de unión al ADN beta hélice-giro-hélice básicos (bHLH-PAS). Un retraso entre la producción y la acción de estos productos de los genes reloj inhibidores se regula por la exportación nuclear de PER, que resulta en oscilaciones estables de la expresión de genes con un periodo de 24 horas (31). *Dec1* y *Dec2*, factores de transcripción con dominios bHLH, regulan a los relojes circadianos de los mamíferos. El heterodímero CLOCK:BMAL2 aumenta la expresión de los genes *Dec1* y *Dec2*. Los productos de estos genes, DEC1 y DEC2, suprimen la expresión de *Per* y *Cry* (32). Como resultado de estos bucles de retroalimentación, los niveles circadianos de las proteínas oscilan de forma rítmica.

La estimulación lumínica activa la expresión de varios genes en el SNC, con patrones diferentes de expresión. Por ejemplo, el nivel de expresión de *Per1* alcanza su pico a los 30-45 minutos tras un pulso de luz, mientras que *Per2* tiene una menor activación. La luz también incentiva la unión de CRY1a al dominio de transactivación de BMAL bloqueando la dimerización activa de CLOCK y BMAL1 e inhibiendo por tanto su función (33). La actividad serotoninérgica posiblemente resetee el reloj circadiano en el SNC (34). El efecto de la luz nocturna en la expresión de los genes reloj periféricos depende del órgano y el momento del día, en coordinación con el sistema nervioso autónomo que modifica esta expresión. Sin embargo, el contacto con la luz induce la expresión de *Dec1* en el SNC, y de *Per1* y *Per2* en el resto de tejidos (35).

El papel exacto de la proteína TIMELESS (TIM) en los mamíferos en el mecanismo del reloj circadiano no está muy claro. TIM forma un heterodímero con PER y se transloca al núcleo, donde inhibe la actividad de CLOCK:BMAL1 en el promotor *mPer1* (36).

Otro mecanismo regulador es controlado por miRNAs, pequeñas moléculas que regulan la expresión de genes a nivel post-transcripcional, reprimiendo la traducción o por destrucción directa de sus mRNA diana (37). Por ejemplo, miR-132 es un miRNA que se induce en respuesta a la estimulación lumínica en el SNC de ratones. La expresión de miR-132 regula de forma negativa el proceso de inducción por la luz del reloj circadiano a través de la regulación de un número de genes que están asociados con el remodelado de la cromatina (*MeCP2*, *JmjC*, *JARID1A*) y proteínas que participan en la traducción (BTG2 y PAIP2A) (38).

Finalmente, hay otras moléculas que interactúan con los genes reloj y tienen efectos importantes en los procesos de oscilación circadiana. Por ejemplo, RACK1 es una proteína que regula la función de PER1 (39). La activación de la cascada de MAPK es capaz de disparar la oscilación circadiana de la expresión de genes (40). Niveles fluctuantes de las hormonas esteroideas del ovario a lo largo del ciclo regulan el ritmo de expresión de genes reloj en los tejidos reproductivos (41).

Es obvio que, en el mundo industrializado, hay un cambio en la iluminación ambiental de un sistema basado en la luz solar a un sistema basado en la electricidad. Los estilos de vida actuales fuerzan cada vez a más gente a trabajar en horarios nocturnos, trabajar con horarios irregulares o permanecer de noche despierto realizando otras actividades y prolongando la exposición a luz artificial. Estudios epidemiológicos correlacionan la

ruptura de los ritmos circadianos con una incidencia aumentada de cáncer de mama y un peor pronóstico de la enfermedad.

7.2 Alteraciones de los genes reloj en el cáncer

Los principales genes reloj pueden participar en la tumorigénesis. La alteración de los ritmos circadianos se ha asociado a varias formas de cáncer en humanos. Cada vez encontramos en la literatura científica más evidencias correlacionando cambios en el mecanismo del reloj con la patogénesis del cáncer (42). La alteración de estos genes acelera la progresión tumoral y, con la restauración de los ritmos circadianos, podríamos potencialmente mejorar el pronóstico. A continuación, describiremos de manera general la relación entre algunos tipos de cáncer y la disrupción del sistema circadiano, antes de detallar en el siguiente capítulo los descubrimientos que han aparecido en la literatura en los últimos años.

Por ejemplo, en el cáncer de mama, se ha descrito un descenso de los niveles de expresión de *Per1* y *Per2* en comparación con el tejido mamario sano. La inhibición de la expresión de *Per1* es mayor en los casos de cáncer de mama familiar que en los esporádicos, lo que sugiere una relación entre pérdida de regulación del reloj y el carácter hereditario de este tipo de cáncer. La metilación de los promotores de *Per1* y *Cry1* podría conducir a la supervivencia de las células tumorales del cáncer de mama gracias a la pérdida de su expresión y disrupción del ritmo circadiano de la célula. Además, en la población de China se ha descrito un mayor riesgo de cáncer de mama asociada a polimorfismos de los genes reloj (42).

La inactivación epigenética de *Bmal1* vía hipermetilación de islas de citosina-guanina (CpG) en su promotor contribuye al desarrollo de linfoma no-Hodgkin y leucemia linfocítica aguda, probablemente como consecuencia de la interrupción del reloj circadiano celular y la pérdida de ritmicidad circadiana de genes como *c-myc*, catalasa y p300 (43). Variaciones genéticas en *Cry2* y la mutación Ala394Thr en NPAS2 aumentan la susceptibilidad hereditaria al linfoma no-Hodgkin. La metilación en CpG del gen *hPer3* se ha observado en pacientes con leucemia mieloide crónica (44).

En el cáncer de próstata, los únicos factores de riesgo bien establecidos son la edad avanzada, historia familiar de la enfermedad y la raza. La disrupción circadiana podría convertirse en un nuevo factor de riesgo. Se ha determinado que existe una asociación entre variaciones genéticas de los genes reloj y el desarrollo tumoral de la próstata. Los genes reloj y el receptor para andrógenos (RA) se expresan con oscilaciones circadianas en una próstata sana. *Per1* inhibe la actividad transcripcional del RA. La pérdida de la regulación de *Per1*, parece contribuir a la tumorigénesis en la próstata (45).

Una importante desregulación de los genes reloj es uno de los mecanismos básicos que conduce al mesotelioma. La expresión del protooncogen *c-myc* está bajo regulación circadiana, en la misma fase que *Per1*, en las células del neuroblastoma. También se ha descrito que los índices de expresión de *Per1* y *Per2* son anormalmente bajos en células de glioma. *Per1* y *Per2* parece que están involucrados en la supresión de la proliferación de las células cancerígenas pancreáticas (46).

La interrupción circadiana promueve la carcinogénesis en el hígado y posiblemente participe en su inicio, tal y como se ha observado en ratones expuestos al carcinógeno hepático dietilnitrosamina. El hepatoma tiene el mismo patrón de oscilación circadiana que las células normales, pero es menos sensible a las señales circadianas alternativas, como pueden ser las comidas, conduciendo a una disociación de los ritmos circadianos tanto en cáncer como en las células sanas del hígado (47).

Los niveles de expresión de los genes reloj centrales *Cry1* y *Bmal1* se relacionan con parámetros clínicos en el cáncer de ovario epitelial, y una combinación de los niveles de expresión bajos de ambos es un factor pronóstico independiente, como lo son el estadio y el subtipo histológico. La interrupción del reloj circadiano, tras la metilación CpG del promotor en los genes *Per1*, *Per2* o *Cry1*, esta probablemente involucrado en el desarrollo de cáncer de endometrio. Los niveles de expresión de *TIM* se encuentran elevados en tejido tumoral de pacientes con cáncer colorrectal (48).

Varios receptores nucleares están implicados en la expresión de los relojes periféricos y constituyen uniones moleculares entre los genes reloj y las funciones metabólicas. Los niveles de expresión de *PER1-3*, *CRY1-2*, *CK1e* y *TIM* están disminuidos en pacientes con leucemia mieloide crónica. La supresión tumoral por la señalización ATM-p53 es una función fisiológica controlada por los relojes, y su interrupción provoca la activación oncogénica de *c-myc* en ratones. β -Catenina aumenta los niveles de β -TrCP y acorta la vida media de *PER2*, lo que puede convertirse en un mecanismo de transformación neoplásica del epitelio intestinal (49).

La implicación de los genes circadianos en varias formas de cáncer está suficientemente respaldada por la información ya dada, y futuras investigaciones se encargarán de dar evidencia para aclarar su papel biológico.

7.3 Mecanismos alterados por la pérdida de la ritmicidad circadiana en la génesis del cáncer

7.3.1 Reparación del ADN y ritmicidad circadiana

El reloj circadiano determina la fuerza de las respuestas celulares al daño del ADN, incluyendo los mecanismos de reparación del ADN. Las vías por las que se consigue la reparación mantienen la estabilidad genética frente al daño inducido por estímulos tanto exógenos como endógenos. Varios componentes de estas vías parece que son iniciados por osciladores circadianos. Por ejemplo, la reparación de nucleótidos por escisión es un mecanismo de reparación de ADN que protege al genoma de daño causado por algunas fuentes, como irradiación de luz ultravioleta y mutágenos químicos (50).

Tip60 es una histona acetilasa, con funciones de respuesta a daño y reparación de ADN, que está sobreexpresada en células resistentes a cisplatino y, si la silenciamos, hacemos a las células sensibles a este quimioterápico. Tip60 está regulada por *Clock*, indicando que la reparación de ADN por acetilación de histonas está bajo regulación circadiana (51).

7.3.2 Proliferación celular y el crecimiento de las células cancerígenas

El ritmo de proliferación de las células tumorales sigue patrones cíclicos diferentes de las de tejido normal. La interrupción del ritmo circadiano celular está asociado a alteraciones en la proliferación de las células cancerígenas. Una menor producción de *Per1* o *Per2* aumenta el crecimiento de estas células *in vitro* a ciertas horas específicas del día, y aumenta el crecimiento del tumor *in vivo*. *Per1* y *Per2* actúan como supresores tumorales inhibiendo la proliferación celular y el crecimiento tumoral en cáncer de mama (in vivo) siguiendo un patrón de expresión circadiana (52). Ratones deficientes en *mPer2* tienen mayor incidencia de tumores confirmando la función de supresor tumoral de este factor. Mutaciones del reloj inhiben significativamente el crecimiento y proliferación celular inhibiendo la progresión a través del ciclo celular y así reduce la capacidad de las células mutantes para responder a señales mitogénicas. Por contra, la eliminación de la proteína CLOCK funcional, no afecta al índice de carcinogénesis en ratones tras radiación ionizante. Estos datos sugieren la existencia de relaciones complejas entre carcinogénesis inducida por estrés y el reloj circadiano (53).

La síntesis de ADN en células tumorales parece que está modulada por varios factores, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). El PDGF promueve la vascularización del tumor, adhesión, invasión y agresividad de las células cancerígenas. La inhibición de esta vía sincroniza el ritmo de síntesis de ADN en las células tumorales y las células normales de la médula ósea. La síntesis de ADN y la actividad de las telomerasas, que evitan la entrada en apoptosis de las células, se expresan con patrón circadiano en las células de cáncer hepático. (54). Los interferones (IFNs) son citoquinas multifuncionales con actividad anti-tumoral. Se ha descrito que el receptor del IFN- β . tiene un ritmo de expresión diurno en células tumorales xenoimplantadas (55).

7.3.3 Mecanismo de acción de los genes circadianos en el cáncer

Los mecanismos moleculares que se ponen en marcha tras la alteración de los genes reloj en el cáncer están siendo poco a poco elucidados. Por ejemplo, la disminución en la actividad de *Per2* aumenta los niveles de β -catenina y de su diana, la ciclina D1, induciendo la proliferación celular en el cáncer de colon y la formación de pólipos en colon e intestino, lo que sugiere que el producto de *Per2* suprime la tumorigénesis en el intestino y el colon por la inhibición de las β -cateninas y sus vías de señalización. Recíprocamente, el aumento de β -cateninas en las células del cáncer aumenta la degradación de PER2. La supresión de la expresión de β -catenina inhibe la proliferación celular en los adenomas intestinales (56).

La interrupción de los relojes circadianos periféricos intestinales contribuye, en parte, a la transformación neoplásica del epitelio en el cáncer colorectal en humanos. La expresión circadiana de la dihidropirimidina deshidrogenasa, una enzima implicada en el metabolismo en el fármaco quimioterápico 5-Fluorouracilo, parece regulada por *Per2* en los tumores de colon de alto grado (57).

TfR1 es un receptor de membrana necesario para incorporar el hierro a las células desde la transferrina. La sobreexpresión de TfR1 se asocia a una mayor proliferación celular y a la progresión maligna a cáncer colorectal. Este receptor muestra un ritmo de expresión circadiano regulado por *c-myc*, un gen controlado por el reloj (58). También se ha

descrito una disminución significativa de los niveles de Rev-ER-β y *Per1* en tumores colorectales indiferenciados. La Caseína quinasa (CK1ε) va a fosforilar a PER2, llevando a su degradación por el proteasoma 26S. Por esto, la inhibición de CK1ε por IC261, un inhibidor del dominio quinasa, tiene un efecto de supresor tumoral ya que ralentiza la degradación de PER2 (59).

La metilación de los promotores de los genes *Per* causa una pérdida de regulación en su expresión, lo que incrementa la proliferación de las células de cáncer de mama. *Per1* también media en la inhibición de la proliferación en una línea de células del cáncer de páncreas en humanos (MIA-PaCa2) por TNF-α. La expresión de *Per1* se ve suprimida por TNF-α, y un silenciamiento de *Per1* disminuye la proliferación de las células MIA-PaCa2 (60).

El jetlag crónico aumenta el riesgo de varios cánceres en ratones, y las mutaciones en genes circadianos hacen a los ratones más susceptibles a desarrollar cáncer. Los niveles de las proteínas CLOCK y PER2 están disminuidas, mientras que los niveles de BMAL1 están aumentadas en las células de cáncer de próstata cuando se comparan con células humanas normales epiteliales del mismo origen. La melatonina resincroniza los genes reloj nucleares desregulados en las células de cáncer de próstata gracias a un aumento de la expresión de *Clock* y *Per2*, y una disminución de la expresión de *Bmal1*, lo que sugiere unos efectos preventivos de la melatonina frente a la pérdida de ritmicidad que)

Cancer type (and effect)	Trigger	Circadian genes/proteins
Sporadic and familial breast tumors	Decreased expression levels	<i>Per1, Per2</i>
Familial breast tumors (than sporadic)	Lower expression levels	<i>Per1</i>
Survival of breast cancer cells	Methylation of promoters	<i>Per1, Cry1</i>
Proliferation of breast cancer cells	Methylation of promoters	<i>Per</i>
Higher risk of breast cancer	Polymorphisms	<i>Clock</i>
Inhibits breast cancer cell proliferation and tumor growth	Expression	<i>Per1</i>
Breast cancer cell proliferation and tumor growth	Downregulation	<i>Per2</i>
ER/PR-negative cases of breast cancer	SNPs	<i>Clock</i>
Breast cancer	Histone acetyltransferase activity	CLOCK (protein)
Tumor apoptosis in breast cancer	Increased expression	<i>Per2</i>
Prostate cancer risk and hormone-related breast cancer	SNPs	<i>NPAS2</i>
Non-Hodgkin lymphoma and acute lymphocytic leukemia	Epigenetic inactivation (via CpG hypermethylation)	<i>Bmal1</i>
Non-Hodgkin lymphoma	Genetic variations, functional polymorphism	<i>Cry2, NPAS2</i>
Chronic myeloid leukemia	Methylation	<i>Per3</i>
Prostate cancer	Downregulation	<i>Per1</i>
Prostate cancer	Increased expression level	<i>Per2, Clock</i>
Prostate cancer	Decreased expression levels	<i>Bmal1</i>
Glioma	Lower expression rates	<i>Per1, Per2</i>
Suppression of proliferation in pancreatic cancer	Expression	<i>Per1, Per2</i>
Proliferation of human pancreatic cancer cell line	Knockdown	<i>Per1</i>
Epithelial ovarian cancer	Low expression levels	<i>Cry1, Bmal1</i>
Endometrial cancer	CpG methylation	<i>Per1, Per2, Cry1</i>
Colorectal cancer	Increased expression level	<i>Tim</i>
Colon cancer	Downregulation	<i>Per2</i>
Undifferentiated colorectal tumors	Decreased expression levels	<i>Per1</i>
Chronic myeloid leukemia	Downregulation	<i>Per1, Per2, Per3, CRY1-2, TIM</i>
Intestinal epithelial neoplastic transformation	PER2 protein degradation	<i>Per2</i>

Figura 5. Muestra la asociación de distintos genes reloj y proteínas con una variedad de tipos de cáncer (tabla tomada de C. Savvidis et al, Circadian rythm disruption in cancer biology, 2012).

La mayoría de las alteraciones que se describen en el cáncer en relación a los genes reloj, son por media de variaciones en los niveles de expresión de una o varias de las proteínas sintetizadas por estos. Una recopilación de las distintas alteraciones de estos genes y su relación con una variedad de tipos de cáncer, se recogen en la tabla de arriba (figura 5), además de otros tipos desencadenantes, como pueden ser las modificaciones epigenéticas, como veremos más adelante.

7.3.4 Modificaciones de la epigenética en los genes reloj

Las modificaciones de la epigenética son cambios hereditarios que ocurren independientemente de los cambios en la secuencia del ADN y están involucrados en la regulación de la transcripción de genes. La metilación del ADN y las modificaciones en las histonas son los principales mecanismos de modificación epigenética. Cambios en la metilación del ADN acompañan al inicio y progresión del tumor. Las regiones promotor de los genes supresores tumorales están metiladas en el cáncer, resultando en el silenciamiento génico. Además, esta metilación lleva a una inestabilidad cromosómica (62). Para ilustrar esto, hay un estudio que analizó los niveles de metilación de los promotores de 5 genes reloj, CLOCK, BMAL1, CRY1, PER1 y PER2, en mujeres enfermas de cáncer de mama que trabajaban en turnos nocturnos y comparándolos con un grupo de control de enfermas trabajadoras con horario diurno. Los genes CLOCK, BMAL1, CRY1 y PER1 resultaron tener mayores niveles de metilación en el grupo de trabajadoras nocturnas, y dentro de este los niveles aumentaban con las horas y el tiempo que llevaban trabajando (63).

La acetilación es la principal, pero no la única, modificación post-transcripcional de las histonas nucleosomales que interviene en el inicio y progresión del cáncer. La acetilación de las histonas está controlada por las enzimas histona acetiltransferasa (HAT) e histona deacetilasa (HDAC). Una alteración en la actividad de HAT o en HDAC podría tener un papel en la invasión tumoral y metástasis (64). Sin ir más lejos, los genes Clock y Tip60 cumplen función de HAT y hay estudios que los relacionan con la resistencia a distintos fármacos quimioterápicos en algunos tipos de cáncer, como lo que pasa en el cáncer de pulmón que se ha relacionado la sobreexpresión de Tip60 con la resistencia a cisplatino por la hiperacetilación de las histonas H3K14 y H4K16 (65).

7.4 Interacciones entre el entorno y los genes reloj

La activación del *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) por 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) inhibe la expresión del gen *Per1* bloqueando la unión de CLOCK:BMAL1 al promotor de *Per1*. Este es un ejemplo que ilustra que cómo los contaminantes atmosféricos podrían contribuir a la carcinogénesis (66). La interrupción de los genes reloj *Per1* y/o *Per2* modifican la glándula mamaria y la respuesta hepática a la toxina ambiental TCDD alterando la expresión de los genes p450 (67).

La activación de AhR por TCDD provoca cambios en los ritmos circadianos en las células madre de la hemopoyesis y en los ovarios de los ratones. *Per1* sensibiliza a las células cancerígenas para activar la apoptosis ante daño de doble cadena del ADN, como el provocado por radiaciones ionizantes (68).

7.5 Genes reloj en la progresión del cáncer, metástasis y angiogénesis

La interrupción del ritmo circadiano promueve el crecimiento tumoral y la angiogénesis/estromagénesis, especialmente el desarrollo de fibroblastos y endotelio vascular, inducido por la sobreexpresión de WNT10A en el estroma de las células tumorales como resultado de unos niveles elevados de estrés oxidativo. La expresión elevada de *mPer1* que encontramos en el estroma tumoral podría afectar a las interacciones entre las células cancerígenas y las del estroma, lo que podría relacionarse con la progresión cancerígena y las metástasis (69).

El ritmo circadiano de la metionina aminopeptidasa, que está relacionada con la tumorigénesis y la angiogénesis tumoral está regulado por la transcripción de genes reloj (estimulado por el heterodímero mCLOCK:mBMAL1 e inhibido por mPER2 o mCRY1). Así, los efectos de la melatonina exógena en el crecimiento tumoral dependen de la hora de la administración (70). El receptor 1 de la laminina (Lamr1) es importante en bastantes procesos tanto fisiológicos como patológicos, incluyendo diferenciación celular y viabilidad, desarrollo del cáncer, invasión, migración y metástasis. Lamr1 interacciona con la proteína reloj humana hPER1 pero no tiene un patrón de expresión circadiano (71). CLOCK:BMAL1 y sirtuina 1 (SIRT1) forman un complejo regulador de la expresión de CLOCK cromatina con los promotores de los genes controlados por el reloj. Las proteínas SIRT son un tipo único de histona deacetilasas importantes en la regulación de la expresión de genes, especialmente en el silenciamiento génico. Sin embargo, esta actividad muestra oscilación circadiana contribuyendo al control circadiano. SIRT1 está involucrada en el desarrollo de varios tipos de cáncer, como el de próstata, mama y colorrectal, así como en la resistencia a quimioterapia de las células cancerígenas (72).

8. GENES RELOJ Y CÁNCER

Una vez ya vistas las vías de funcionamiento y la importancia de los genes reloj en todas las etapas de la carcinogénesis vamos a revisar en este bloque los datos más recientes publicados en la literatura científica acerca de los mismos y las últimas novedades sobre éstos para hacernos una idea de la situación actual en cuanto al impacto real que tienen y que están destinados a tener en un futuro.

Para empezar, tenemos que decir que si uno busca en la literatura de no muchos años atrás hasta hoy, va a encontrar una mayoría de estudios a favor y algunos en contra en cuanto a la evidencia de correlación entre alteraciones en las vías de señalización de los genes reloj y el cáncer. Sin embargo, algunos trabajos recientes parecen establecer esta correlación de una manera clara y definitiva. Por ejemplo, un estudio publicado por Mocellin S et al en este mismo año 2018.

La disfunción del reloj circadiano y los polimorfismos únicos de algunos genes circadianos se han relacionado con la susceptibilidad al cáncer, aunque los datos recogidos en la literatura eran escasos y los hallazgos eran en muchas ocasiones inconsistentes. El objetivo de este estudio fue investigar la asociación entre la variación genética de la vía circadiana y el riesgo de desarrollar cánceres comunes tras analizar los

resultados obtenidos en 3 meta-análisis de estudios de asociación de genoma completo (GWAS) de mama, próstata y pulmón (73).

Los resultados fue una asociación estadística muy fuerte entre las variaciones genéticas de los genes circadianos y el riesgo de cáncer de mama ($p=0'0000019$), próstata ($p=0'0000041$) y pulmón ($p=0'00000069$) (73), demostrando de una manera concluyente la asociación.

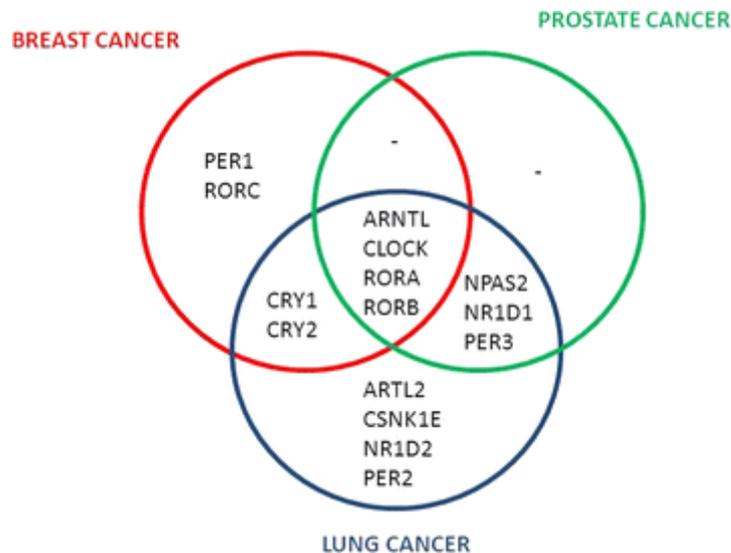


Figura 6. Estudio de asociación de genoma completo. De los 17 genes reloj incluidos en el estudio, 15 obtuvieron una asociación significativa con el riesgo de cáncer: 4 genes eran compartidos con los tres tipos de cáncer (ARNTL, CLOCK, RORA y RORB), 2 compartidos entre mama y pulmón (CRY1 y CRY2), y 3 por próstata y pulmón (NPAS2, NR1D1 y PER3), aunque 4 genes eran específicos de cáncer de pulmón (ARNTL2, CSNK1E, NR1D2 y PER2) y 2 de cáncer de mama (PER1 y RORC) (Imagen tomada de Mocellin S. et al, Circadian pathway genetic variation and cáncer risk: evidence from genome wide association studies, 2018).

A continuación, en los apartados siguientes vamos a recopilar la información de los genes más estudiados atendiendo a la forma en la que se ven modificados en los distintos tipos de cáncer, en un intento de establecer un orden temporal y causal de las distintas investigaciones hasta la fecha. He seleccionado los genes Per1, Per2 y Bmal1/Arntl por ser los que mayor atención (medida en número de trabajos dirigidos a ellos) hay en la actualidad. En cuanto a los tipos de cáncer a estudiar, he seleccionado el cáncer oral de células escamosas (por ser, con diferencia, el que más estudios aporta), mama y próstata (por curiosidad científica al encontrarme con ellos en numerosas ocasiones durante la elaboración de este trabajo), y los de pulmón y colorrectal (por su alta incidencia e importancia en la sociedad actual).

8.1 Per1

8.1.1 Carcinoma oral de células escamosas

La mayor parte de los datos referentes al papel de PER1 en el carcinoma oral de células escamosas han sido obtenidos en la línea celular SCC15 (obtenida originariamente de un paciente varón de 55 años con cáncer de lengua).

Partiendo de la hipótesis de que una inhibición de PER1 por debajo de lo normal está altamente correlacionada con la carcinogénesis y el desarrollo de tumores, se utilizó esta línea celular para obtener una variante en la cual PER1 se expresa en menor nivel mediante el uso de shRNAs. Como consecuencia, las células experimentan una mayor tasa de crecimiento, se hacen resistentes a la apoptosis y adquieren mayor capacidad de migración e invasión. Cuando son inyectadas en ratones BALB/c nu/nu subcutáneamente, crecen más rápidamente y los tumores alcanzan volúmenes mayores que aquellos que se producen tras la inyección de las SCC15 originales, lo que sugiere que PER1 es un importante supresor tumoral. A nivel molecular, la supresión de PER1 incrementa la expresión de ki-67, MDM2, Bcl-2 y MMP2, genes implicados en procesos como invasión o resistencia a apoptosis, y disminuye la expresión de genes como p53, TIMP-2 o BAX, que actúan como apoptóticos y se consideran por tanto supresores de tumores (74).

Siguiendo con esta línea de trabajo, las células SCC15 se forzaron a expresar de manera constitutiva y estable un shRNA que deprime la expresión de PER1, para caracterizar las alteraciones en la expresión génica de genes relacionados con el ciclo celular, proliferación, apoptosis y capacidad tumorigénica *in vivo*. Los resultados obtenidos mostraron una expresión incrementada, en respuesta a la supresión de PER1, de las ciclinas D1, E, B1, CDK1 y WEE1, así como un descenso en la expresión de p53, p21, p16, ciclina A2 y CDC25. Además, la capacidad tumorigénica de esta línea celular se ve incrementada tras la supresión de PER1. Estos resultados sugieren que este gen reloj lleva a cabo su función como supresor de tumores a través de la regulación de la vía de señalización de las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclina (75). Resultados muy similares se obtuvieron en un trabajo publicado prácticamente a la vez que el anterior. La supresión de PER1 en las células SCC15 incrementa la expresión de las ciclinas D1, B1, E, así como CDK1 y WEE1, mientras que la expresión de p53, p16, p21, cdc25 y ciclina A2 fue menos. Algunos otros genes, como RB1 o E2F, no vieron alterada su expresión tras la supresión de PER1 (76).

Otro estudio utilizó una estrategia similar para suprimir la expresión de PER1 en la misma línea celular, y posteriormente estudiar la expresión de genes pertenecientes a la red de genes reloj, tanto *in vitro* como *in vivo*, tras inyectar las células en ratones desnudos donde, en concordancia con los trabajos ya citados, desarrollaron tumores de manera más rápida y agresiva que las células originales. Los resultados obtenidos demuestran que algunos genes responden a la supresión de PER1 con una disminución en su expresión, como por ejemplo PER2, DEC1, DEC2, CRY1, CRY2 y NPAS2, mientras que otros (PER3, TIM, ROR α y REV-ERB) aumentan sus niveles de manera significativa, lo que indica que la alteración de la expresión de PER1 conduce a una desregulación sinérgica de muchos otros genes reloj (77).

En resumen, los datos obtenidos con respecto a PER1 y el carcinoma oral de células escamosas indican que este gen reloj actúa como supresor de tumores, de tal manera que su supresión va a alterar positivamente la expresión de genes anti-apoptóticos y otros relacionados con proliferación e invasividad, mientras que disminuye la expresión de genes apoptóticos y supresores de tumores. Además, la modificación de los niveles de PER1 va a alterar a su vez los niveles de otros genes reloj en este tipo de cáncer.

8.1.2 Cáncer de pulmón

La mayor parte de los trabajos publicados que relacionan alteraciones en los niveles de PER1 con el cáncer de pulmón, han usado líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) en sus ensayos.

Estableciendo como punto de partida la ya conocida función de Per1 como supresor tumoral, Gery et al se propusieron estudiar el papel de la epigenética en el silenciamiento de Per1. Analizando líneas celulares NSCLC de pacientes esperaron encontrar niveles de Per1 deprimidos, y es lo que encontraron. Al forzar la expresión de Per1 vieron que se reducía el tamaño tumoral y disminuía la supervivencia de los clones tumorales. La sospecha del silenciamiento de Per1 en el cáncer de pulmón, apunta a que se deba a la hipermetilación del ADN y la acetilación de la histona H3, tal y como proponen otros estudios previos (78).

En relación con el estudio anterior, pero realizado de una manera independiente del anterior, otro grupo de trabajo quiso entablar una relación entre la expresión de los tres genes PER y con la situación clínica de pacientes con NSCLC. En este estudio se comparó muestras de tejido canceroso con tejido pulmonar sano adyacente y el resultado fue que a medida que los niveles de Per1 eran menores, el grado de diferenciación celular disminuía, aumentaba el estadio TNM (extensión del tumor, diseminación a los ganglios y metástasis en ganglios linfáticos). Por lo tanto, en este trabajo se demostró que los niveles de Per1 se relacionan con el tiempo de supervivencia y su pérdida promueve la progresión tumoral en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (79).

8.1.3 Cáncer de mama

Llama la atención que los trabajos que relacionan el gen Per1 con el cáncer de mama, se basan en la ya conocida relación con Per2, y por su cierta homología con éste, Per1 acaba por ser también el objeto de estudio. La mayoría de los trabajos relacionan a los dos genes PER a la vez y en todos excepto uno, usan muestras de tejido mamario tumoral de pacientes para sus estudios.

El primer trabajo acerca de la relación de los genes PER con el cáncer de mama apareció publicado en 2005. En él, se pretendía confirmar la existencia de niveles disminuidos de los genes PER en este tipo de cáncer, y para eso analizaron una batería de 55 muestras de cáncer de mama de mujeres taiwanesas. Comparando los niveles de expresión de los genes PER en tejido tumoral con el tejido sano adyacente, los resultados revelaron una alteración en su expresión en >95% de los casos. Este grupo de trabajo propuso la hipótesis de que la desregulación de los genes PER no está causada por alteraciones genéticas, sino que está más relacionada con la metilación de los promotores de PER1 Y PER2. Esta hipermetilación guarda una estrecha relación con la expresión de c-erbB2, también alterada en estas muestras. Por lo tanto, se convierte en el primer grupo de trabajo en proponer que las alteraciones en la expresión de PER son las que provocan la interrupción del control del reloj circadiano y por tanto, favorecer la supervivencia de las células cancerígenas (80).

Otro grupo de trabajo distinto partía de una hipótesis de trabajo ligeramente distinta a la del grupo anterior, ya que contaban con datos previos en los que se demostraba la

existencia de una relación entre el gen BRCA1 y las proteínas Per1 y Per2. De esta forma, desarrollaron un nuevo estudio en el que compararon los niveles de Per en muestras de cáncer de mama familiar y esporádico, con un grupo control de tejido mamario sano. Se encontró una disminución de Per1 y de Per2 en los tejidos tumorales en comparación con los sanos, y aparte, una disminución aún mayor en el tejido de cáncer de mama familiar frente al de cáncer esporádico. Esta disminución también se demostró asociada a los tumores negativos para el receptor de estrógenos. Por lo tanto, no contradicen la importancia de las alteraciones en la expresión de Per en el desarrollo de cáncer de mama, pero resaltan un peso adicional en la disminución de los niveles de PER a la causa genética, a través de los resultados obtenidos en el cáncer de mama familiar. Además, establecieron una correlación con negatividad para receptores de estrógenos, y por tanto, con los tumores de peor pronóstico (81).

Varios estudios posteriores siguen la línea de estos dos que hemos comentado, aportando información similar y confirmando los hallazgos. Destaca uno de ellos que aportó una novedad importante: en experimentos *in vitro*, observaron que las células de cáncer de mama tienen dos picos de máximo crecimiento cada 24 horas, y por esto se procedió a analizar los niveles de expresión de Per1 a lo largo del día. Se estableció una relación inversa entre los picos de expresión de Per1 y los de crecimiento tumoral *in vivo*, por lo tanto Per1 parece llevar a cabo un control de la supresión tumoral efectivo sólo a determinadas horas del día (82).

Por último cabe resaltar un estudio en el que se determinaron los niveles de Per1, Per2 y Cry1 en ratones FVB/N de distintas edades en los que habían introducido previamente el gen HER-2/neu para inducirles tumores mamarios. Los resultados obtenidos demostraron que se produce una disminución de Per1 y Per2 a lo largo del tiempo en la vida de estos ratones (83).

En resumen, el gen Per1 se ha estudiado en relación al cáncer de mama gracias a los conocimientos previos acerca del papel de Per2 en este cáncer y a la ya conocida función supresora de Per1. Los hallazgos se centran en la importancia tanto de los factores genéticos como epigenéticos en el desarrollo tumoral del cáncer de mama, así como de analizar su actividad circadiana, estableciendo así las bases de una posible cronoterapia en este tipo de cáncer.

8.1.4 Cáncer de próstata

En el momento actual, resulta llamativo el escaso número de publicaciones que aparecen en la literatura científica con el propósito de caracterizar la alteración de los genes reloj con los tipos de cáncer hormono-dependientes, entre los que se encuentra el de próstata. Pese a proponerse en múltiples trabajos como uno de los cánceres en los que las alteraciones de los ritmos y de los genes reloj podrían tener una mayor repercusión, son muy pocos los estudios realizados acerca de los genes analizados en esta revisión, siendo solo Per1 el único para el cual se han encontrado resultados interesantes.

Basándose en la importancia de la regulación hormonal por parte de los genes reloj, se planteó un estudio en el que se relacionaban los niveles de Per1 con la patogénesis del cáncer de próstata y, en efecto, se encontraron con unos niveles disminuidos de Per1

en tejido tumoral, en comparación con tejido prostático sano. Este estudio demostró como Per1 inhibió la activación de los receptores de andrógenos (AR) y como consecuencia, disminuyó la expresión de genes sensibles a andrógenos (84).

8.1.5 Cáncer colorrectal

Tras buscar en las bases de datos acerca de la relación de los genes reloj con este tipo de cáncer, hemos encontrado que el número de publicaciones al respecto es mayor de lo esperado teniendo en cuenta, por ejemplo, las existentes en relación a los cánceres de mama o próstata. A diferencia de lo que hemos visto hasta ahora, las investigaciones publicadas van más encaminadas en demostrar la asociación del cáncer colorrectal con Per1 de una forma más clínica o fisiopatológica. A pesar de esto, aún no son muchos los trabajos que se han centrado en analizar de forma más específica la relación entre los genes reloj entre sí, destacando las que se limitan a determinar si están o no alterados en el tejido tumoral.

El primer trabajo relevante en este apartado parte de la idea de que la enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), que presenta oscilación circadiana, se muestra disminuida en las células de cáncer de colon, por lo que trataron de demostrar una asociación con Per1. Tras analizar muestras de tejido tumoral de pacientes y compararlas con mucosa intestinal sana se comprobó que en efecto, los niveles de DPD y Per1 se reducían casi a la mitad, en una proporción muy similar en las células de tejido tumoral y, no solo eso sino que esta asociación resultó ser más intensa conforme aumentaba el grado de pérdida de diferenciación tumoral. Curiosamente, la disminución y correlación de DPD y Per1 fue aún más pronunciada en mujeres que en hombres (85).

En esta línea de trabajo y tras la sospecha de que esta diferencia encontrada entre sexos pudiera ser de causa hormonal, el mismo grupo de trabajo vuelve a analizar los niveles de Per1 pero esta vez comparándolos con los receptores de estrógenos alfa y beta ($ER\alpha$ y $ER\beta$) en muestras de tejido colorrectal tumoral. En este nuevo estudio analizaron individualmente la diferencia entre sexos en la disminución de Per1, con un resultado positivo, en efecto en mujeres esta disminución era más acusada. La expresión de $ER\beta$ también estaba reducida, aunque no encontraron diferencias entre sexos con respecto a esta disminución. Por otro lado, no se detectaron cambios en la expresión de Per2 ni de $ER\alpha$. Cabe resaltar que los niveles de CLOCK, que también fue analizado en este ensayo, se encontraban elevados en las muestras de pacientes varones. Por lo tanto Per1 y $ER\beta$ guardan correlación y se encuentran en niveles inferiores a lo normal en el cáncer colorrectal, y, junto a CLOCK, podrían marcar una diferencia distintiva de género en el papel del reloj celular en el desarrollo del cáncer colorrectal (86).

En otro grupo de trabajo distinto al anterior también se buscó comprobar la asociación de Per1 y $ER\beta$ en el cáncer colorrectal en la población china. Este estudio confirmó la disminución de los niveles de expresión tanto de Per1 como de $ER\beta$ en estas células, así como con la diferencia del sexo en la reducción de Per1, pero aportando algunos datos novedosos: los niveles reducidos de Per1 se correlacionaban con mayor frecuencia de metástasis a distancia, y la disminución de $ER\beta$ se asoció con la edad. Sin embargo no se

consiguió establecer una correlación con la supervivencia global o la supervivencia libre de enfermedad (87).

8.2 Per2

8.2.1 Carcinoma oral de células escamosas

En el primer estudio que nos encontramos desde un punto de vista cronológico, se sometió a 90 hámsteres a ciclos de luz/oscuridad de 12h cada uno, y aplicando dimetibenzantraceno en la mucosa de la boca se les provocó el carcinoma oral. Se les sacrificó en dos tandas, una a las 6 semanas y otra a las 14 semanas, ambas divididas en 6 periodos de 4h (desde las 0h hasta las 24h), y se recogieron muestras tanto de mucosa normal, como de lesiones premalignas y de tejido canceroso para analizar mediante RT-PCR los niveles de mRNA no solo de Per2, sino también de otros genes bajo control circadiano como son VEGF, Ki67, c-Myc y p53. Los resultados obtenidos permitieron concluir que la expresión de Per2, VEGF, p53 y c-Myc presenta oscilaciones circadianas en los tres estadios, pero no ocurre así con Ki67 que sólo la conserva en tejido normal y lesiones precancerosas. También se detectaron niveles de Per2 y p53 disminuidos en los tejidos con lesión cancerosa establecida, mientras que los de VEGF, c-Myc y Ki67 estaban aumentados (88).

En continuación con el anterior trabajo, se quiso indagar algo más en el mecanismo específico por el que los niveles de expresión de Per2 se alteraban en el cáncer, y para ello se usó, como ya hemos visto previamente, un shRNA para deprimir la expresión de Per2 en la línea celular Tca8113. En este estudio se demostró que la depresión de Per2 conduce a un incremento en la tasa de proliferación celular (lo que se puede explicar debido a que los niveles de expresión de las ciclinas A2, B1 y D1, CDK4, CDK6 y E2F1 estaban aumentados), junto a una disminución de la apoptosis (en concordancia con unos reducidos niveles de p53, p16 y p21). Por lo tanto, de manera similar a lo que ya se había determinado para Per1 en este tipo de cáncer, Per2 también participa en la regulación del ciclo celular a través de las vías de señalización de las ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas y los inhibidores de estas quinasas (89).

Casi un año más tarde, otro grupo de investigación usando tecnología de interferencia de RNA (RNAi) *in vitro*, en células SCC15 encontró que el silenciamiento de Per2 se acompañaba de un incremento en los niveles de expresión de una serie de genes relacionados con el cáncer, para ser más concretos, de Ki67, MDM2, c-Myc, Bcl-2, MMP2 y VEGF; y de unos niveles de expresión de p53, Bax y TIMP-2 significativamente disminuidos. Estos resultados se correlacionan con el experimento *in vivo* en el que las variantes de SCC15 con Per2 silenciado xenotransplantadas en ratones experimentaron una actividad tumoral mayor (90).

Siguiendo el orden cronológico en las publicaciones, unos meses más tarde un nuevo estudio planteó la idea de correlacionar los niveles de Per2 con el tiempo de supervivencia de los pacientes con carcinoma oral de células escamosas. Para llevarlo a cabo se tomaron muestras tumorales de pacientes reales y se compararon con la mucosa sana adyacente a la lesión. El resultado fue que, en las células tumorales, los niveles de Per2, PTEN, p53, p14ARF y caspasa-8, estaban reducidos en comparación con la mucosa sana. No solo eso, si no que los pacientes cuyas muestras tumorales tenían

niveles más reducidos de Per2 pertenecían a un estadio clínico más avanzado, muchos de ellos ya con metástasis linfáticas (91).

Por último, a principios de este mismo año se vuelve a estudiar los efectos del silenciamiento de Per2 con shRNA en la línea celular SCC15 pero esta vez para ver como interactúa con otros genes del reloj celular. Se demostró que en las células con Per2 deprimido, los niveles de mRNA de Per3, Bmal1, DEC1, DEC2, CRY2, TIMELESS, ROR α y Npas2 también se encontraban disminuidos, mientras que por el contrario los de NR1D1 y PER1 estaban incrementados (92).

Resumiendo, los estudios hasta la actualidad que relacionan PER2 con el carcinoma oral de células escamosas, apuntan a que se puede catalogar como un potente gen supresor tumoral. Su principal efecto reside en el control de la vía de las ciclinas/quinasas para el control del ciclo celular, y está íntimamente relacionado con otros genes supresores. Aparte de esto, queda demostrado que funciona como regulador del reloj circadiano celular al participar en el control de la expresión de gran parte de los demás genes reloj. Además, los diferentes niveles que presenta en los diferentes estadios de la enfermedad, podría significar en un futuro la posibilidad de darle un papel de biomarcador para los pacientes con cáncer oral de células escamosas y de esperanza de vida.

8.2.2 Cáncer de pulmón

La literatura que relaciona la expresión de PER2 con el cáncer de pulmón es algo más extensa, siendo posiblemente el gen reloj más ampliamente estudiado en este cáncer y más considerado por la comunidad científica hasta el momento.

Los primeros estudios acerca de PER2 se realizaron en una línea celular de cáncer de pulmón conocida como células cancerígenas de Lewis (LLC). Los primeros pasos en este campo se dieron transfiriendo vectores de expresión de mPer2 a líneas de LLC *in vivo*. Estas líneas celulares aumentaron la expresión de la proteína PER2 lo que se asoció a una disminución de la proliferación de las células tumorales y al incremento de la tasa de apoptosis (93).

Siguiendo la línea de este trabajo, otros estudios corroboraron el papel de supresor tumoral de PER2 en tumores LCC en ratones, aportando nuevos datos de alteración en otros genes encargados de regular el ciclo celular. La sobreexpresión de Per2 condicionaba una disminución de los genes anti-apoptóticos c-Myc, Bcl-X y Bcl-2, mientras que aumentaban los niveles de p53 y Bax. De esta forma logran caracterizar el papel en la supresión tumoral de Per2 induciendo la apoptosis celular, inhibiendo los genes anti-apoptóticos y estimulando la expresión de otros pro-apoptóticos (94). Este mismo grupo de trabajo, poco más de un año más tarde, publicó otro trabajo en el que se estimuló el aumento de Per2 intratumoral con polietilenimina en ratones en los que se habían inoculado células LLC. Volvieron a demostrar el papel supresor de Per2 en este tipo de cáncer, pero con la diferencia de que esta vez demostraron además que se producía la inhibición de PCNA, proteína nuclear encargada de la reparación de daño en el ADN (95).

Pasando a una línea de trabajo distinta, otros grupos de trabajo utilizaron para su investigación líneas celulares de cáncer no microcítico de pulmón (NSCLC). En este estudio se analizaron los niveles de Per2 en 60 muestras de NSCLC y en 20 de tejido sano pulmonar y se encontraron que la tasa de expresión de Per2 fue de 71'7% y 95'0%, respectivamente. Este estudio nos vuelve a remarcar la disminución de Per2, esta vez en células NSCLC, y lo relaciona con un peor estadio TNM, el desarrollo y la invasión tumoral (96). Un año más tarde, aparece publicado el artículo que ya hemos mencionado al hablar de la relación de PER1 y el cáncer de pulmón, que analizó la expresión de las proteínas PER (entra las que se encuentra PER2) en relación a la situación clínica de pacientes con NSCLC, con unos resultados en consonancia con los que acabamos de citar, es decir, peor estadio clínico, TNM, y mayor invasividad (79).

Para terminar con los efectos de la alteración de Per2 en el cáncer de pulmón, recientemente aparece una línea de trabajo totalmente distinta y que pretende establecer una relación entre los niveles de Per2 y la resistencia a fármacos, y para ello se usaron células A549/DPP, una línea celular de adenocarcinoma de pulmón resistente a cisplatino. Los resultados obtenidos mostraron como estas células tienen niveles de Per2 reducidos. El silenciamiento de Per2 mediante shRNA confiere a las células resistencia a la apoptosis y activa los mecanismos de proliferación y migración. Esto se debe a que la anulación de Per2 provoca una estimulación de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR y, por contrario, su sobreexpresión reduce la activación de esta vía, facilitando la entrada en apoptosis de las células tumorales (97).

Resumiendo, Per2 es un gen muy estudiado en el cáncer de pulmón, y su relación con este tipo de tumor está siendo cada vez más clara debido al número creciente de trabajos que así lo van estableciendo. Aparte de comportarse como un potente gen supresor tumoral que ejerce su acción promoviendo la apoptosis, está directamente relacionado con el estadio clínico de cáncer de pulmón y es un fiel indicador de la esperanza de vida. Ha demostrado tener también un papel en la resistencia a fármacos quimioterapéuticos, y lo más importante es que se ha demostrado la reducción de su expresión en 3 tipos distintos de cáncer pulmonar, lo que ha llevado a establecer su papel regulador de un mecanismo crucial en el desarrollo y progresión tumoral, a nivel general, como ya se sabe que es, la estimulación de la apoptosis.

8.2.3 Cáncer de mama

El gen Per2 ha demostrado tener una implicación muy importante en el desarrollo de este tipo de cáncer y esto ha llamado la atención de la comunidad científica, convirtiéndose en un "hot-spot" en la investigación contra el cáncer en la actualidad.

Voy a comenzar hablando de un trabajo inicial que analizó los efectos de la supresión génica de Per2 en ratones. Estos ratones perdían la noción del tiempo, como se demostró en los actogramas obtenidos (midiendo la actividad que ejercían en la rueda giratoria) que era totalmente desincronizada. Además envejecían más rápido y eran más propensos a desarrollar fenotipos neoplásicos. En estos ratones, la supresión de Per2 condicionó una pérdida en la regulación de la expresión de otros genes implicados en la regulación del ciclo celular y en la supresión tumoral, tales como c-Myc, ciclinas D1 y A, Mdm-2 y Gadd45 α . La importancia de este estudio es que se publica muy cerca,

temporalmente hablando, de los primeros ensayos que relacionaban Per2 con el cáncer de mama (98).

Entre los primeros trabajos que tratan de caracterizar los efectos de Per2 en el cáncer de mama, se encuentran los ya citados cuando hablé de Per1, que nos resaltan la importancia de los factores genéticos y epigenéticos en la depresión de la expresión de Per en el cáncer de mama. En sintonía con estos estudios, un grupo de trabajo decide comparar distintas variantes genéticas comparando 406 pacientes con cáncer de mama y 412 controles, y determinando las variaciones genéticas (polimorfismos) en los genotipos de los genes Clock y Per2 (rs2304672, rs2304669, rs934945). Los resultados fueron que las personas con el genotipo rs2304669-TT de Per2 mostraron un aumento del riesgo de cáncer de mama en comparación con los individuos TC o CC. Por el contrario, se comprobó que los otros genotipos estudiados no estaban relacionados con un mayor riesgo de cáncer de mama. Por lo tanto el locus rs2304669 se puede convertir en un biomarcador de susceptibilidad al cáncer de mama (99).

Hasta este momento, las investigaciones se centraban en asociar el descenso de Per2 con la mayor incidencia y severidad del cáncer de mama, y por eso surge un equipo de trabajo que intenta desentrañar el mecanismo molecular por el cual dicha asociación se establece. Utilizando RNAi y RNAhc para disminuir la expresión de Per2 en líneas celulares *in vitro* e *in vivo*, primero comprobaron que éstas llegaban a duplicar su velocidad de crecimiento celular *in vitro* y de crecimiento tumoral *in vivo*. Del estudio se comprobó que los niveles de las ciclinas D y E aumentaban cuando Per2 disminuía, por lo que Per2 es capaz de regular la vía de las ciclinas en el ciclo celular (100).

En esta línea de trabajo, surge otro estudio que consigue dar una evidencia más detallada de la función supresora de Per2 en el cáncer de mama. Descubrieron que la pérdida de Per2 potenciaba la expresión de genes de transición epitelio-mesénquimal (EMT), entre los que se incluían TWIST, SLUG Y SNAIL. Demostraron que Per2 llevaba a cabo una función de correpresor transcripcional reclutando proteínas EZH2, SUZ12 y HDAC2 para formar un complejo con el factor de transcripción OCT1-POU2F1, en el sitio de unión de TWIST1 Y SLUG, lo que en definitiva lleva a la activación de los genes EMT. Por último, demostraron que la hipoxia, una situación común que se produce durante el crecimiento del tejido tumoral, causa la degradación de PER2, lo que lleva a la activación de los genes EMT (101).

Otros grupos de investigación han contemplado aspectos diferentes a la hora de caracterizar el papel de Per2 en el cáncer de mama. Se ha publicado un estudio relacionando a Per2 con los receptores de estrógenos ER α , de tal forma que altos niveles de Per2 favorecen la degradación de ER α , mientras que bajos niveles de este gen reloj conducen a una estabilización de ER α . Además, comprobaron que la presencia de estrógenos estimula la expresión de Per2, estableciendo así un mecanismo de retroalimentación que controla el exceso de estimulación estrogénica. Estos datos complementan la información que ya se conocía de que la sobreexpresión de Per2 en cáncer de mama produce una inhibición del crecimiento, y estimula la apoptosis (102).

En la línea de esta nueva idea, recientemente se ha establecido una relación entre la ausencia de Per2 y la resistencia a la quimioterapia, en concreto, entre expresión de Per2 y la sensibilidad a la doxorubicina. Para ello se trabajó con células de epitelio

mamario normal (MCF-12) y células de cáncer de mama MDA-MB-231, negativas para el receptor de estrógenos (ER-). La expresión de Per2 mostró un ritmo circadiano de 24h en ambas líneas celulares, con la salvedad de que su silenciamiento sensibiliza a las células MDA-MB-231, previamente quimiorresistentes, a la doxorubicina (103).

8.2.4 Cáncer colorrectal

Al igual que pasaba al buscar la información correspondiente al gen Per1 en este tipo de cáncer, nos encontramos con varios trabajos que manejan los genes reloj de manera general, y son pocos aquellos que analizan cada uno de estos genes de manera individual.

Cabe destacar que la obtención de ratones con Per2 mutado (m/m), permitió comprobar como estos son más propensos a los linfomas y tienen la expresión de genes reguladores del ciclo celular, como ciclina D y c-Myc, alterados. Con este mismo modelo de ratón se buscó determinar el papel de Per2 en el desarrollo tumoral del cáncer colorrectal, y para ello se usaron líneas celulares de colon HCT116. El primer resultado obtenido fue una correlación inversa entre niveles disminuidos de Per2 y niveles aumentados de beta-catenina. A continuación se compararon ratones m/m con ratones m/m Apc Min/+, a los que adicionalmente se les había mutado el gen supresor de tumores Apc (Adenomatous polyposis coli,). Los resultados fueron que los ratones m/m desarrollaron pólipos colónicos, con niveles de beta-catenina y ciclina D aumentados en todo el tejido intestinal. Por otra parte, los ratones m/m Apc Min/+ desarrollaron el doble de pólipos con anemia más grave y esplenomegalia comparándolos con ratones Apc/+. Analizando estos datos, se concluyó que Per2 suprime el desarrollo tumoral por la disminución de las beta-cateninas y los genes diana de las beta-cateninas en el cáncer colorrectal (104).

Cuando se analizaron los niveles de Per2 en 38 pacientes distintos con cáncer de colon, los resultados mostraron que las células más diferenciadas tenían más posibilidades de mantener los niveles de expresión de Per2 normales que las poco diferenciadas. Además, también encontraron asociación de los niveles disminuidos de Per2 con la edad, el grado histológico, el estadio TNM, y la expresión de Ki67. En cambio, no se encontró relación ni con p53 ni con c-erbB-2 (105).

Por último, se buscó la identificación de genes implicados en el control del ciclo celular que se asocien con Per2 en el cáncer de colon. Para ello se estudiaron piezas quirúrgicas resecadas de pacientes con cáncer de colon y se compararon los niveles de expresión en las células tumorales con las de tejido sano adyacente, y se identificaron siete genes que guardaban correlación positiva con Per2 (*hus1*, *gadd45α*, *rb1*, *cdkn2a*, *cdk5rp1*, *mre11a*, *sumo1*) y dos genes con correlación negativa (*cdc20*, *birc5*). En un segundo análisis, se midieron los niveles de estos genes en los pacientes agrupados en 3 grupos distintos dependiendo de su TNM. La expresión de los genes relacionados positivamente con Per2 resultó ser dependiente del estadio, al igual que pasaba con los relacionados negativamente, y sobre todo se detectó la diferencia de niveles en el tejido tumoral. La expresión de *cdc20* y *birc5* estaba aumentada en el tejido adyacente y disminuida en el tumoral (106).

Estos datos indican que el mecanismo por el cual Per2 ejerce su función supresora en el cáncer de colon, es a través de la regulación de las beta-cateninas, y una serie de genes relacionados con el ciclo celular. Hace falta aún más investigación en este campo, para corroborar los datos obtenidos hasta el momento y caracterizar más a fondo las rutas de señalización intracelular que se ven modificadas cuando Per2 está inhibido.

8.3 Bmal1/Arntl

8.3.1 Carcinoma oral de células escamosas

La alteración de Bmal1 en relación específica a un tipo de cáncer en la literatura científica aún no está muy explotada. Es más fácil encontrarla mencionada en revisiones de varios genes en las que se limitan a decir si están alterados o no. Aun así, al parecer, ha demostrado relacionarse con la sensibilidad a fármacos en varios tipos de cáncer y es por eso que probablemente muchos grupos de investigación se dediquen al estudio de Bmal1 y cáncer en los próximos años.

En cuanto a sus efectos en el carcinoma de células escamosas podemos encontrar un primer estudio, en el que intentando buscar alguna conexión entre la pérdida de PTEN (molécula reguladora de la vía de señalización PI3K) con alguna alteración del reloj circadiano, se determinó que Bmal1 parece ser uno de los genes alterados. Así, se relacionó la pérdida de PTEN con una activación de la señalización mTOR y ésta a su vez al gen Bmal1. Este aumento de Bmal1 inducido por PTEN depende exclusivamente de la vía mTOR, y así se demostró al administrar rapamicina (un inhibidor de mTOR) lo que devolvió a la normalidad los niveles de Bmal1; mTOR a su vez requiere de las proteínas Rictor y Raptor para su regulación, por lo tanto, éstas van a tener un papel crítico en la regulación de Bmal1 (107).

Un segundo grupo de trabajo utilizó líneas celulares de carcinoma oral escamoso para comprobar la acción supresora de Bmal1 sobre la proliferación y ver si aumentaba la sensibilidad a paclitaxel. En las muestras habían niveles de Bmal1 muy reducidos pero estos se aumentaron por administración ectópica con lo que se inhibió la proliferación, migración y la invasión en los ensayos *in vitro*. En los ensayos en ratones también se demostró una mejoría del tamaño tumoral. Por lo tanto con estos resultados demostraron la acción antitumoral de Bmal1. En un segundo tipo de experimento, se trataron las células con paclitaxel, y las células con niveles de Bmal1 aumentados eran las más susceptibles de entrar en apoptosis, lo que era un reflejo de su mayor sensibilidad al paclitaxel. Las bases moleculares de este efecto parecen residir en la relación reguladora establecida entre Bmal1, TERT y el represor transcripcional oncogénico EZH2, cuyo reclutamiento por el promotor de TERT favorece la apoptosis inducida por paclitaxel (108).

8.3.2 Cáncer de pulmón

Con respecto a la relación entre Bmal1 y el cáncer de pulmón, los primeros estudios que encontramos dirigidos a comprobar el posible papel de este gen reloj en este tipo de cáncer ya parten de que Bmal1 ha demostrado su potencial antitumoral en estudios previos en otras clases de tumores. Por lo tanto, en una primera aproximación las

investigaciones se han dirigido a determinar la función de Bmal1 con respecto a la capacidad de invasividad tumoral usando como modelo líneas celulares A549 de adenocarcinoma de pulmón.

Este primer grupo de trabajo utilizó iRNA para anular Bmal1 y en efecto comprobaron que la invasividad se veía potenciada, mientras que en aquellos cultivos en los que promocionaron su sobreexpresión, se redujo. La diferencia hasta ahora está en que este mecanismo de acción parece ser independiente de los niveles de p53. Para ser más concretos, la función de Bmal1 probablemente consiste en inhibir la vía PI3K/AKT/MMP2, de tal forma que cuando se deprime la expresión de Bmal1, la actividad de esta vía se incrementa enormemente. Esta vía a su vez conecta directamente con el oncogen Bcl-w, por lo que en un segundo tipo de experimentos se analizó la relación existente entre Bmal1 y Bcl-w, obteniendo como resultados, la existencia de una relación inversa. Es decir, en las muestras con Bmal1 aumentado, Bcl-w estaba inactivo, se encontraban niveles disminuidos de MMP2 y por tanto el potencial invasor de las células era menor; en cambio en las células que tenían Bmal1 deprimido, Bcl-w estaba en pleno funcionamiento con mayores niveles de MMP2 lo que resultó en mayor invasividad (109).

8.3.3 Cáncer de mama

Sobre la relación específica del gen Bmal1 con el cáncer de mama, actualmente no hay estudios publicados. Aunque si puede verse su inclusión en otros tipos de estudios más generales que abordan la alteración en conjunto de una batería de genes reloj, entre los que se encuentra Bmal1. Puede destacarse un estudio que se aventura a proponer una aparente relación entre Bmal1 y las metástasis a ganglios linfáticos en el cáncer de mama, sin entrar en descifrar los mecanismos moleculares subyacentes (110).

8.3.4 Cáncer colorrectal

En cuanto al peso de Bmal1 en el cáncer colorrectal, volvemos a tener un número relativamente importante de trabajos que confirman su alteración, pero pocos que demuestren directamente la relación que guardan entre ellos. Aun así, destaca un estudio que pretende comprobar el efecto de Bmal1 a la hora de modificar la sensibilidad al oxaliplatino de las células tumorales. Para ello estudian tres líneas celulares de cáncer colorrectal distintas, HCT116, THC8307, y HT29. En el estudio se demostró cómo la sobreexpresión de Bmal1 no solo frenó la proliferación celular, si no que aumentó la sensibilidad del cáncer colorrectal al oxaliplatino en las tres líneas celulares in vitro. Sólo comprobaron que la HCT116 presentó los mismos resultados in vivo. Además, la supervivencia global fue más larga (27 meses frente a 19 meses) en los tumores primarios con niveles elevados de Bmal1. Finalmente, estos resultados se atribuyeron a la capacidad de Bmal1 de regular, mediante la vía ATM, la detención del ciclo celular en G2-M (111).

9. CONCLUSIONES

En vistas de los datos recopilados en esta revisión sistemática del mecanismo funcional del reloj circadiano, he podido sacar como primera conclusión, que aún no hay un esquema de acción validado con total seguridad, aunque la gran mayoría de las teorías de funcionamiento y de ensayos que lo han investigado han llegado a conclusiones similares. Sin duda se trata quizás de uno de los sistemas de regulación más complejos de los seres orgánicos al tener tantos factores intermediarios y encargarse de una gran batería de acciones, cada vez más extensa a medida que el conocimiento progresa.

De mi trabajo de investigación se puede sacar en claro que la participación de los genes reloj en el desarrollo tumoral, gracias en gran parte a la acción supresora de la gran mayoría de ellos, en especial PER1 y PER2, está claramente demostrada. Tal es así que cada vez hay más artículos relacionando estos genes con distintos tipos de cáncer, aunque en la actualidad solo se haya explotado esta investigación para un número reducido de ellos.

La importancia de estos genes en relación al cáncer no solo reside en su acción supresora y, por consecuente con la pérdida de su expresión se facilita el desarrollo, crecimiento e invasión de los tumores, sino que también se han descrito diferencias en los resultados con fármacos quimioterápicos, en los que la acción de los genes reloj es capaz de modificar la resistencia tumoral al efecto tóxico del fármaco.

Finalmente me gustaría destacar la necesidad de más investigación en el futuro, dado la importancia y el potencial real que tienen los genes reloj y su implicación en el cáncer. Seguramente en la medicina del día de mañana podemos contar con test de detección precoz o incluso de cribado que involucren a alguno de estos relojes; incluso terapias farmacológicas contra el cáncer que tenga como objetivo modificar la expresión de estos en las células cancerígenas, o potenciar la ya establecida cronoterapia.

10. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar a todos mis compañeros, el haber crecido juntos a lo largo de estos 6 años, y apoyarnos tanto en las buenas como en las malas, ya que han pasado a ser mi segunda familia. A la Facultad y todo su personal docente por haberme dado las herramientas para continuar. A los profesionales de la salud con los que haya coincidido en los rotatorios del hospital, por mostrarme la meta por a que estoy luchando, y por enseñarme a levantar la cabeza de la teoría y ver la realidad a la que me voy a tener que enfrentar.

Y por último, y con especial aprecio a mi tutor y director, el Profesor Catedrático Carlos Manuel Martínez Campa de la UC, testigo tanto de mis primeros pasos por esta facultad, con Fisiología General, como de los últimos, con este trabajo de fin de grado. Agradecerle su paciencia y su diligencia a lo largo de cada apartado escrito en este documento.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Sep;68(9):2112–6.
2. Reddy P, Zehring WA, Wheeler DA, Pirrotta V, Hadfield C, Hall JC, et al. Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell*. 1984 Oct;38(3):701–10.
3. Sánchez Barceló EJ. Hicimos la luz...y perdimos la noche: efectos biológicos de la luz. Vol. 9. Santander: Editorial de la Universidad de Cantabria; 2017.
4. Swann JM, Turek FW. Multiple circadian oscillators regulate the timing of behavioral and endocrine rhythms in female golden hamsters. *Science*. 1985 May 17;228(4701):898–900.
5. Münch M, Bromundt V. Light and chronobiology: implications for health and disease. *Dialogues Clin Neurosci*. 2012 Dec;14(4):448–53.
6. Harmer SL, Panda S, Kay SA. Molecular Bases of Circadian Rhythms. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001 Nov;17(1):215–53.
7. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*. 2004 Sept;25(3–4):177–95.
8. Reiter R, Rosales-Corral S, Tan D-X, Acuna-Castroviejo D, Qin L, Yang S-F, et al. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2017 Apr 17;18(4):843.
9. Vijayalaxmi, Reiter RJ, Herman TS, Meltz ML. Melatonin and radioprotection from genetic damage: in vivo/in vitro studies with human volunteers. *Mutat Res*. 1996 Dec 20;371(3–4):221–8.
10. Fic M, Gomulkiewicz A, Grzegorzolka J, Podhorska-Okolow M, Zabel M, Dziegiel P, et al. The Impact of Melatonin on Colon Cancer Cells' Resistance to Doxorubicin in an in Vitro Study. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun 29;18(7):1396.
11. Chen L, Liu L, Li Y, Gao J. Melatonin increases human cervical cancer HeLa cells apoptosis induced by cisplatin via inhibition of JNK/Parkin/mitophagy axis. *Vitr Cell Dev Biol - Anim*. 2018 Jan 25;54(1):1–10.
12. Martínez-Campa C, Menéndez-Menéndez J, Alonso-González C, González A, Álvarez-García V, Cos S. What is known about melatonin, chemotherapy and altered gene expression in breast cancer. *Oncol Lett*. 2017 Apr;13(4):2003–14.
13. Parent M-É, El-Zein M, Rousseau M-C, Pintos J, Siemiatycki J. Night work and the risk of cancer among men. *Am J Epidemiol*. 2012 Nov 1;176(9):751–9.
14. Kloog I, Haim A, Stevens RG, Portnov BA. Global Co-Distribution of Light at Night (LAN) and Cancers of Prostate, Colon, and Lung in Men. *Chronobiol Int*. 2009 Jan 7;26(1):108–25.

15. Deng N, Kohn TP, Lipshultz LI, Pastuszak AW. The Relationship Between Shift Work and Men's Health. *Sex Med Rev.* 2018 Jan 19
16. Al-Naggar RA, Anil S. Artificial Light at Night and Cancer: Global Study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(10):4661–4.
17. Devore EE, Warner ET, Eliassen AH, Brown SB, Beck AH, Hankinson SE, et al. Urinary Melatonin in Relation to Postmenopausal Breast Cancer Risk According to Melatonin 1 Receptor Status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017 Mar;26(3):413–9.
18. Cos S, Mediavilla D, Martínez-Campa C, González A, Alonso-González C, Sánchez-Barceló EJ. Exposure to light-at-night increases the growth of DMBA-induced mammary adenocarcinomas in rats. *Cancer Lett.* 2006 Apr 28;235(2):266–71.
19. Blask DE, Brainard GC, Dauchy RT, Hanifin JP, Davidson LK, Krause JA, et al. Melatonin-depleted blood from premenopausal women exposed to light at night stimulates growth of human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer Res.* 2005 Dec 1;65(23):11174–84.
20. Benna C, Helfrich-Förster C, Rajendran S, Monticelli H, Pilati P, Nitti D, et al. Genetic variation of clock genes and cancer risk: a field synopsis and meta-analysis. *Oncotarget.* 2015 Jul 18;8(14):23978–95.
21. Buhr ED, Takahashi JS. Molecular Components of the Mammalian Circadian Clock. In: *Handbook of experimental pharmacology.* 2013. p. 3–27.
22. Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, et al. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell.* 2002 May;109(3):307–20.
23. Hogenesch JB, Ueda HR. Understanding systems-level properties: timely stories from the study of clocks. *Nat Rev Genet.* 2011 Jun 10;12(6):407–16.
24. Kornmann B, Schaad O, Bujard H, Takahashi JS, Schibler U. System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. O'Rahilly S, editor. *PLoS Biol.* 2007 Feb;5(2):e34.
25. Devlin PF, Kay SA. Circadian photoperception. *Annu Rev Physiol.* 2001 Mar;63(1):677–94.
26. Reppert SM, Weaver DR. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol.* 2001 Mar;63(1):647–76.
27. Jim HSL, Lin H-Y, Tyrer JP, Lawrenson K, Dennis J, Chornokur G, et al. Common Genetic Variation in Circadian Rhythm Genes and Risk of Epithelial Ovarian Cancer (EOC). *J Genet genome Res.*2(2).
28. Wood PA, Xiaoming Yang X, Hrushesky WJM. Clock Genes and Cancer. *Integr Cancer Ther.* 2009 Dec 29;8(4):303–8.

29. Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science*. 2003 Oct 10;302(5643):255–9.
30. Chen R, Schirmer A, Lee Y, Lee H, Kumar V, Yoo S-H, et al. Rhythmic PER abundance defines a critical nodal point for negative feedback within the circadian clock mechanism. *Mol Cell*. 2009 Nov 13;36(3):417–30.
31. Kondratov R V, Chernov M V, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Gudkov A V, Antoch MP. BMAL1-dependent circadian oscillation of nuclear CLOCK: posttranslational events induced by dimerization of transcriptional activators of the mammalian clock system. *Genes Dev*. 2003 Aug 1;17(15):1921–32.
32. Nakashima A, Kawamoto T, Honda KK, Ueshima T, Noshiro M, Iwata T, et al. DEC1 modulates the circadian phase of clock gene expression. *Mol Cell Biol*. 2008 Jun 15;28(12):4080–92.
33. Tamai TK, Young LC, Whitmore D. Light signaling to the zebrafish circadian clock by Cryptochrome 1a. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Sep 11;104(37):14712–7.
34. Cuesta M, Mendoza J, Clesse D, Pévet P, Challet E. Serotonergic activation potentiates light resetting of the main circadian clock and alters clock gene expression in a diurnal rodent. *Exp Neurol*. 2008 Apr;210(2):501–13.
35. Cailotto C, Lei J, van der Vliet J, van Heijningen C, van Eden CG, Kalsbeek A, et al. Effects of nocturnal light on (clock) gene expression in peripheral organs: a role for the autonomic innervation of the liver. Bartell PA, editor. *PLoS One*. 2009 May 21;4(5):e5650.
36. Sangoram AM, Saez L, Antoch MP, Gekakis N, Staknis D, Whiteley A, et al. Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron*. 1998 Nov;21(5):1101–13.
37. Cheng H-YM, Papp JW, Varlamova O, Dziema H, Russell B, Curfman JP, et al. microRNA Modulation of Circadian-Clock Period and Entrainment. *Neuron*. 2007 Jun 7;54(5):813–29.
38. Alvarez-Saavedra M, Antoun G, Yanagiya A, Oliva-Hernandez R, Cornejo-Palma D, Perez-Iratxeta C, et al. miRNA-132 orchestrates chromatin remodeling and translational control of the circadian clock. *Hum Mol Genet*. 2011 Feb 15;20(4):731–51.
39. Hu L, Lu F, Wang Y, Liu Y, Liu D, Jiang Z, et al. RACK1, a novel hPER1-interacting protein. *J Mol Neurosci*. 2006;29(1):55–63.
40. Akashi M, Nishida E. Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock. *Genes Dev*. 2000 Mar 15;14(6):645–9.
41. Nakamura TJ, Sellix MT, Kudo T, Nakao N, Yoshimura T, Ebihara S, et al. Influence of the estrous cycle on clock gene expression in reproductive tissues: effects of

- fluctuating ovarian steroid hormone levels. *Steroids*. 2010 Mar;75(3):203–12.
42. Winter SL, Bosnoyan-Collins L, Pinnaduwege D, Andrulis IL. Expression of the circadian clock genes *Per1* and *Per2* in sporadic and familial breast tumors. *Neoplasia*. 2007 Oct;9(10):797–800.
 43. Kuo S-J, Chen S-T, Yeh K-T, Hou M-F, Chang Y-S, Hsu NC, et al. Disturbance of circadian gene expression in breast cancer. *Virchows Arch*. 2009 Apr 19;454(4):467–74.
 44. Taniguchi H, Fernández AF, Setién F, Ropero S, Ballestar E, Villanueva A, et al. Epigenetic inactivation of the circadian clock gene *BMAL1* in hematologic malignancies. *Cancer Res*. 2009 Nov 1;69(21):8447–54.
 45. Zhu Y, Stevens RG, Hoffman AE, Fitzgerald LM, Kwon EM, Ostrander EA, et al. Testing the circadian gene hypothesis in prostate cancer: a population-based case-control study. *Cancer Res*. 2009 Dec 15;69(24):9315–22.
 46. Fujioka A, Takashima N, Shigeyoshi Y. Circadian rhythm generation in a glioma cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jul 21;346(1):169–74.
 47. Filipski E, Subramanian P, Carrière J, Guettier C, Barbason H, Lévi F. Circadian disruption accelerates liver carcinogenesis in mice. *Mutat Res*. 2009 Nov;680(1–2):95–105.
 48. Tokunaga H, Takebayashi Y, Utsunomiya H, Akahira J-I, Higashimoto M, Mashiko M, et al. Clinicopathological significance of circadian rhythm-related gene expression levels in patients with epithelial ovarian cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008 Jan;87(10):1060–70.
 49. Teboul M, Guillaumond F, Gréchez-Cassiau A, Delaunay F. The nuclear hormone receptor family round the clock. *Mol Endocrinol*. 2008 Dec;22(12):2573–82.
 50. Kang T-H, Sancar A. Circadian regulation of DNA excision repair: implications for chrono-chemotherapy. *Cell Cycle*. 2009 Jun 1;8(11):1665–7.
 51. Ikura T, Ogryzko V V, Grigoriev M, Groisman R, Wang J, Horikoshi M, et al. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell*. 2000 Aug 18;102(4):463–73.
 52. Yang X, Wood PA, Ansell CM, Quiton DFT, Oh E-Y, Du-Quiton J, et al. The circadian clock gene *Per1* suppresses cancer cell proliferation and tumor growth at specific times of day. *Chronobiol Int*. 2009 Oct 16;26(7):1323–39.
 53. Antoch MP, Gorbacheva VY, Vykhovanets O, Toshkov IA, Kondratov R V, Kondratova AA, et al. Disruption of the circadian clock due to the *Clock* mutation has discrete effects on aging and carcinogenesis. *Cell Cycle*. 2008 May 1;7(9):1197–204.
 54. Nakagawa H, Koyanagi S, Kuramoto Y, Yoshizumi A, Matsunaga N, Shimeno H, et al. Modulation of circadian rhythm of DNA synthesis in tumor cells by inhibiting

- platelet-derived growth factor signaling. *J Pharmacol Sci.* 2008 Aug;107(4):401–7.
55. Takane H, Ohdo S, Yamada T, Yukawa E, Higuchi S. Chronopharmacology of antitumor effect induced by interferon-beta in tumor-bearing mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Aug;294(2):746–52.
 56. Wood PA, Xiaoming Yang X, Hrushesky WJM. Clock Genes and Cancer. *Integr Cancer Ther.* 2009 Dec 29;8(4):303–8.
 57. Krugluger W, Brandstaetter A, Kállay E, Schueller J, Krexner E, Kriwanek S, et al. Regulation of genes of the circadian clock in human colon cancer: reduced period-1 and dihydropyrimidine dehydrogenase transcription correlates in high-grade tumors. *Cancer Res.* 2007 Aug 15;67(16):7917–22.
 58. Okazaki F, Matsunaga N, Okazaki H, Utoguchi N, Suzuki R, Maruyama K, et al. Circadian Rhythm of Transferrin Receptor 1 Gene Expression Controlled by c-Myc in Colon Cancer-Bearing Mice. *Cancer Res.* 2010 Aug 1;70(15):6238–46.
 59. Eide EJ, Woolf MF, Kang H, Woolf P, Hurst W, Camacho F, et al. Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Mol Cell Biol.* 2005 Apr 1;25(7):2795–807.
 60. Suzuki T, Sato F, Kondo J, Liu Y, Kusumi T, Fujimoto K, et al. Period is involved in the proliferation of human pancreatic MIA-PaCa2 cancer cells by TNF-alpha. *Biomed Res.* 2008 Apr;29(2):99–103.
 61. Jung-Hynes B, Huang W, Reiter RJ, Ahmad N. Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells. *J Pineal Res.* 2010 Aug 27;49(1):60–8.
 62. Kulis M, Esteller M. DNA Methylation and Cancer. In: *Advances in genetics.* 2010. p. 27–56.
 63. Samulin Erdem J, Skare Ø, Petersen-Øverleir M, Notø HØ, Lie J-AS, Reszka E, et al. Mechanisms of Breast Cancer in Shift Workers: DNA Methylation in Five Core Circadian Genes in Nurses Working Night Shifts. *J Cancer.* 2017;8(15):2876–84.
 64. Mottet D, Castronovo V. Histone deacetylases: target enzymes for cancer therapy. *Clin Exp Metastasis.* 2008 Apr 5;25(2):183–9.
 65. Miyamoto N, Izumi H, Noguchi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, Shiota M, et al. Tip60 Is Regulated by Circadian Transcription Factor Clock and Is Involved in Cisplatin Resistance. *J Biol Chem.* 2008 Jun 27;283(26):18218–26.
 66. Xu C-X, Krager SL, Liao D-F, Tischkau SA. Disruption of CLOCK-BMAL1 transcriptional activity is responsible for aryl hydrocarbon receptor-mediated regulation of Period1 gene. *Toxicol Sci.* 2010 May;115(1):98–108.
 67. Qu X, Metz RP, Porter WW, Neuendorff N, Earnest BJ, Earnest DJ. The clock genes period 1 and period 2 mediate diurnal rhythms in dioxin-induced Cyp1A1

- expression in the mouse mammary gland and liver. *Toxicol Lett.* 2010 Jun 16;196(1):28–32.
68. Le Vee M, Jouan E, Fardel O. Involvement of aryl hydrocarbon receptor in basal and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced expression of target genes in primary human hepatocytes. *Toxicol In Vitro.* 2010 Sep;24(6):1775–81.
 69. Geusz ME, Blakely KT, Hiler DJ, Jamasbi RJ. Elevated mPer1 gene expression in tumor stroma imaged through bioluminescence. *Int J cancer.* 2010 Feb 1;126(3):620–30.
 70. Otálora BB, Madrid JA, Alvarez N, Vicente V, Rol MA. Effects of exogenous melatonin and circadian synchronization on tumor progression in melanoma-bearing C57BL6 mice. *J Pineal Res.* 2008 Apr;44(3):307–15.
 71. Liu L, Sun L, Zhao P, Yao L, Jin H, Liang S, et al. Hypoxia promotes metastasis in human gastric cancer by up-regulating the 67-kDa laminin receptor. *Cancer Sci.* 2010 Jul 19;101(7):1653–60.
 72. Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, Sahar S, Hirayama J, Chen D, et al. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell.* 2008 Jul 25;134(2):329–40.
 73. Mocellin S, Tropea S, Benna C, Rossi CR. Circadian pathway genetic variation and cancer risk: evidence from genome-wide association studies. *BMC Med.* 2018 Dec 19;16(1):20.
 74. Li H-X, Fu X-J, Yang K, Chen D, Tang H, Zhao Q. The clock gene PER1 suppresses expression of tumor-related genes in human oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016 Apr 12;7(15):20574–83.
 75. Yang K, Fu X-J, Li H-X, Chen D, Tang H. The important tumor suppressor role of PER1 in regulating the cyclin–CDK–CKI network in SCC15 human oral squamous cell carcinoma cells. *Onco Targets Ther.* 2016 Apr;9:2237.
 76. Xiaojuan F, Kai Y, Hanxue L, Qin Z, Dan C. Effects and mechanism of the circadian clock gene Per1 on the proliferation, apoptosis, cycle, and tumorigenicity in vivo of human oral squamous cell carcinoma. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2016 Jun;34(3):255–61.
 77. Zhao Q, Zheng G, Yang K, Ao Y, Su X, Li Y, et al. The clock gene <i>PER1</i> plays an important role in regulating the clock gene network in human oral squamous cell carcinoma cells. *Oncotarget.* 2016 Oct 25;7(43):70290–302.
 78. Gery S, Komatsu N, Kawamata N, Miller CW, Desmond J, Virk RK, et al. Epigenetic Silencing of the Candidate Tumor Suppressor Gene Per1 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Mar 1;13(5):1399–404.
 79. Liu B, Xu K, Jiang Y, Li X. Aberrant expression of Per1, Per2 and Per3 and their prognostic relevance in non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol.*

2014;7(11):7863–71.

80. Chen S-T, Choo K-B, Hou M-F, Yeh K-T, Kuo S-J, Chang J-G. Deregulated expression of the PER1 , PER2 and PER3 genes in breast cancers. *Carcinogenesis*. 2005 Jul 1;26(7):1241–6.
81. Winter SL, Bosnoyan-Collins L, Pinnaduwege D, Andrulis IL. Expression of the circadian clock genes Per1 and Per2 in sporadic and familial breast tumors. *Neoplasia*. 2007 Oct;9(10):797–800.
82. Yang X, Wood PA, Ansell CM, Quiton DFT, Oh E-Y, Du-Quiton J, et al. The circadian clock gene Per1 suppresses cancer cell proliferation and tumor growth at specific times of day. *Chronobiol Int*. 2009 Oct 16;26(7):1323–39.
83. Kolomeichuk SN, Gurov E V, Piskunova TS, Tyndyk ML, Anisimov VN. Expression of circadian Per1 and Per2 genes in the liver and breast tumor tissues of HER2/neu transgenic mice of different age. *Bull Exp Biol Med*. 2011 Jun;151(2):227–9.
84. Cao Q, Gery S, Dashti A, Yin D, Zhou Y, Gu J, et al. A Role for the Clock Gene Per1 in Prostate Cancer. *Cancer Res*. 2009 Oct 1;69(19):7619–25.
85. Krugluger W, Brandstaetter A, Kallay E, Schueller J, Krexner E, Kriwanek S, et al. Regulation of Genes of the Circadian Clock in Human Colon Cancer: Reduced Period-1 and Dihydropyrimidine Dehydrogenase Transcription Correlates in High-Grade Tumors. *Cancer Res*. 2007 Aug 8;67(16):7917–22.
86. Mostafaie N, Kállay E, Sauerzapf E, Bonner E, Kriwanek S, Cross HS, et al. Correlated downregulation of estrogen receptor beta and the circadian clock gene Per1 in human colorectal cancer. *Mol Carcinog*. 2009 Jul;48(7):642–7.
87. Wang Y, Xing T, Huang L, Song G, Sun X, Zhong L, et al. Period 1 and estrogen receptor-beta are downregulated in Chinese colon cancers. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(7):8178–88.
88. Ye H, Yang K, Tan X, Zhao D, Lü X, Wang Q. Circadian variation of clock gene Per2 and cancer-related clock-controlled genes in buccal mucosa carcinoma of golden hamster at different cancer stages. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2015 Oct;33(5):513–8.
89. WANG Q, AO Y, YANG K, TANG H, CHEN D. Circadian clock gene Per2 plays an important role in cell proliferation, apoptosis and cell cycle progression in human oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2016 Jun;35(6):3387–94.
90. Su X, Chen D, Yang K, Zhao Q, Zhao D, Lv X, et al. The circadian clock gene PER2 plays an important role in tumor suppression through regulating tumor-associated genes in human oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2017 Jan;38(1):472–80.
91. Xiong H, Yang Y, Yang K, Zhao D, Tang H, Ran X. Loss of the clock gene PER2 is associated with cancer development and altered expression of important tumor-related genes in oral cancer. *Int J Oncol*. 2017 Oct 31;52(1):279–87.

92. Ao Y, Zhao Q, Yang K, Zheng G, Lv X, Su X. A role for the clock period circadian regulator 2 gene in regulating the clock gene network in human oral squamous cell carcinoma cells. *Oncol Lett.* 2018 Jan 19;15(4):4185–92.
93. Wang Y, Hua H, Zhu B, Yin H, Liu Y, Yang C, et al. [The influence of circadian gene mPeriod2 on Lewis cancer cell]. *Space Med Med Eng (Beijing).* 2005 Jun;18(3):222–3.
94. Hua H, Wang Y, Wan C, Liu Y, Zhu B, Yang C, et al. Circadian gene mPer2 overexpression induces cancer cell apoptosis. *Cancer Sci.* 2006 Jul;97(7):589–96.
95. Hua H, Wang Y, Wan C, Liu Y, Zhu B, Wang X, et al. Inhibition of tumorigenesis by intratumoral delivery of the circadian gene mPer2 in C57BL/6 mice. *Cancer Gene Ther.* 2007 Sep 22;14(9):815–8.
96. Chi C, He Z, Liu Y, Lin X, Sun C. Expression and clinical significance of circadian gene Per2 in non-small cell lung cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2013 Feb;35(2):129–31.
97. Chen B, Tan Y, Liang Y, Li Y, Chen L, Wu S, et al. Per2 participates in AKT-mediated drug resistance in A549/DDP lung adenocarcinoma cells. *Oncol Lett.* 2017 Jan;13(1):423–8.
98. Lee CC. Tumor Suppression by the Mammalian Period Genes. *Cancer Causes Control.* 2006 May;17(4):525–30.
99. Wang W, Yuan P, Wang J, Ma F, Fan Y, Li Q, et al. Association of genetic variations of circadian clock genes and risk of breast cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2013 Mar;35(3):236–9.
100. Yang X, Wood PA, Oh E-Y, Du-Quiton J, Ansell CM, Hrushesky WJM. Down regulation of circadian clock gene Period 2 accelerates breast cancer growth by altering its daily growth rhythm. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Sep 24;117(2):423–31.
101. Hwang-Verslues WW, Chang P-H, Jeng Y-M, Kuo W-H, Chiang P-H, Chang Y-C, et al. Loss of corepressor PER2 under hypoxia up-regulates OCT1-mediated EMT gene expression and enhances tumor malignancy. *Proc Natl Acad Sci.* 2013 Jul 23;110(30):12331–6.
102. Gery S, Virk RK, Chumakov K, Yu A, Koeffler HP. The clock gene Per2 links the circadian system to the estrogen receptor. *Oncogene.* 2007 Dec 18;26(57):7916–20.
103. Mitchell MI, Engelbrecht A-M. Circadian Rhythms and Breast Cancer: The Role of Per2 in Doxorubicin-Induced Cell Death. *J Toxicol.* 2015;2015:1–11.
104. Wood PA, Yang X, Taber A, Oh E-Y, Ansell C, Ayers SE, et al. Period 2 Mutation Accelerates ApcMin/+ Tumorigenesis. *Mol Cancer Res.* 2008 Nov 1;6(11):1786–93.

105. Wang Y, Hua L, Lu C, Chen Z. Expression of circadian clock gene human Period2 (hPer2) in human colorectal carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2011 Dec 13;9(1):166.
106. Štorcelová M, Vicián M, Reis R, Zeman M, Herichová I. Expression of cell cycle regulatory factors *hus1*, *gadd45a*, *rb1*, *cdkn2a* and *mre11a* correlates with expression of clock gene *per2* in human colorectal carcinoma tissue. *Mol Biol Rep*. 2013 Nov 24;40(11):6351–61.
107. Matsumoto CS, Almeida LO, Guimarães DM, Martins MD, Papagerakis P, Papagerakis S, et al. PI3K-PTEN dysregulation leads to mTOR-driven upregulation of the core clock gene BMAL1 in normal and malignant epithelial cells. *Oncotarget*. 2016 Jul 5;7(27):42393–407.
108. Tang Q, Cheng B, Xie M, Chen Y, Zhao J, Zhou X, et al. Circadian Clock Gene Bmal1 Inhibits Tumorigenesis and Increases Paclitaxel Sensitivity in Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res*. 2017 Jan 15;77(2):532–44.
109. JUNG C-H, KIM EM, PARK JK, HWANG S-G, MOON S-K, KIM W-J, et al. Bmal1 suppresses cancer cell invasion by blocking the phosphoinositide 3-kinase-Akt-MMP-2 signaling pathway. *Oncol Rep*. 2013 Jun;29(6):2109–13.
110. Kuo S-J, Chen S-T, Yeh K-T, Hou M-F, Chang Y-S, Hsu NC, et al. Disturbance of circadian gene expression in breast cancer. *Virchows Arch*. 2009 Apr 19;454(4):467–74.
111. Zeng Z -l., Luo H -y., Yang J, Wu W -j., Chen D -l., Huang P, et al. Overexpression of the Circadian Clock Gene Bmal1 Increases Sensitivity to Oxaliplatin in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2014 Feb 15;20(4):1042–52.