

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA  
REPRODUCCIÓN

# EXPRESIÓN DE GENES RELOJ EN PLACENTA HUMANA A TÉRMINO



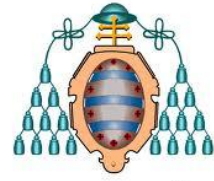
**TRABAJO FIN DE MÁSTER POR**

Lucia Pilar Murias Torrecilla

**TUTORA**

Elena Díaz Rodríguez

**JUNIO 2013**



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**ELENA DÍAZ RODRÍGUEZ**, Profesora Titular del Área de Fisiología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el Trabajo presentado por D<sup>ÑA</sup>. **LUCIA PILAR MURIAS TORRECILLA**, titulado “EXPRESIÓN DE GENES RELOJ EN PLACENTA HUMANA A TÉRMINO”, realizado bajo la dirección de Elena Díaz Rodríguez, dentro del programa de Máster en “Biología y Tecnología de la Reproducción”, reúne a su juicio las condiciones necesarias para ser admitido como Trabajo Fin de Máster, y por ello autoriza la presentación del mismo.

Y para que así conste dónde convenga, firma la presente certificación en Oviedo, a 10 de JUNIO de 2013.

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup>

Fdo. Elena Díaz Rodríguez.

# Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento al Área de Fisiología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo. Adrián, Ainara, Alina, Bea e Inés, gracias por estar siempre dispuestos a ayudarme y darme consejos.

Gracias al Servicio de Obstetricia y Ginecología del HUCA, sobre todo, a la Dra. Cati Fernández-Plaza, y a sus pacientes, por cedernos las muestras.

En especial quiero agradecer a mi tutora Elena Díaz Rodríguez, por haberme guiado a lo largo de todo el proyecto, confiar en mí, y darme mucho apoyo; y a Silvia Pérez López, por prestarme parte de su valioso tiempo y sus conocimientos, sin ti no hubiese sido posible entregar este trabajo a tiempo.

No quiero olvidarme de darle las gracias a mi Familia, sobre todo a mis padres y a mi hermano, que me han animado siempre a estudiar, me ha enseñado a trabajar duro, y han estado todos estos años de carrera y máster siempre a mi lado, tanto en los malos momentos no dejando que me desesperase, como celebrado a mi lado los buenos.

Y a ti, gracias por estar ahí siempre que te necesité. Has hecho por mí mucho más de lo que piensas, y no quiero que eso pase desapercibido.

Compis del máster y amigos de siempre, gracias a vosotros, porque este ha sido uno de los mejores años de mi vida.

*“Todos somos científicos cuando somos niños, pero al crecer, solo algunos conservan un poco de esa curiosidad que es la madre de la ciencia”. (Juan Aguilar M.)*

# Abreviaturas

Ab.....	Absorbancia.
ADN.....	Ácido desoxiribonucleico.
ADNc.....	ADN complementario.
ARN.....	Ácido ribonucleico.
ARNm.....	Mensajero del ácido ribonucleico.
ATP.....	Adenosín trifosfato.
Bmal1.....	Gen reloj <i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear Translocator - like</i> (Arntl), más conocido por Bmal1.
CKIe.....	Enzima Caseín kinasa Ie.
Clock.....	Gen reloj <i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i> .
Cry.....	Gen reloj Criptocromo.
Ct.....	Ciclo en el que se detecta un aumento significativo de la fluorescencia en la PCR.
EMS.....	Ethyl methanesulfonato ( $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{C}_2\text{H}_5$ ).
ENU.....	N-ethyl-N-nitrosourea ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$ ).
GCS.....	Ganglio cervical superior.
GnRH.....	Hormona liberadora de gonadotrofinas.
HUCA.....	Hospital Universitario Central de Asturias.
LH.....	Hormona luteinizante.
LO.....	Ciclo luz-oscuridad.
NSQ.....	Núcleo supraquiasmático.
OMS.....	Organización mundial de la salud.
PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa.

Per.....Gen reloj Period.

Rev-Erb..... Rev-ErbA alpha.

SNC.....Sistema nervioso central.

RT.....Retrotranscripción.

TC.....Tiempo Circadiano.

# Índice

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	pág1.
<b><u>1. PLACENTA</u></b> .....	pág1.
<b>1.1. Desarrollo y estructura</b> .....	pág1.
<b>1.2. Aspecto macroscópico de la placenta madura</b> .....	pág1.
<b>1.3. Membranas fetales</b> .....	pág2.
<b>1.4. Funciones</b> .....	pág3.
<b>1.4.1. Barrera</b> .....	pág4.
<b>1.4.2. Transporte e intercambio</b> .....	pág5.
<b>1.4.3. Endocrina</b> .....	pág5.
<b><u>2. SISTEMA CIRCADIANO</u></b> .....	pág5.
<b><u>3. COMPONENTES DEL SISTEMA CIRCADIANO</u></b> .....	pág6.
<b>3.1. Reloj central. Entradas y salidas</b> .....	pág6.
<b>3.2. Componentes moleculares del NSQ: Genes reloj</b> .....	pág8.
<b>3.3 Principales genes reloj</b> .....	pág8.
<b>3.3.1. Gen <i>Per</i></b> .....	pág8.
<b>3.3.2. Gen <i>Cry</i></b> .....	pág10.
<b>3.3.3. Gen <i>Clock</i></b> .....	pág11.
<b>3.3.4. Gen <i>Bmal</i></b> .....	pág12.
<b>3.4. Activación/inactivación de genes reloj</b> .....	pág13.
<b>3.5. Relojes periféricos</b> .....	pág15.

3.5.1. Relojes periféricos y reproducción.....pág17.

**4. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN RÍTMICA DE LOS GENES**.....pág19.

4.1. Trastornos reproductivos.....pág23.

**5. GENES RELOJ Y PLACENTA**.....pág26.

**HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**.....pág29.

1. **JUSTIFICACIÓN**.....pág29.

2. **HIPOTESIS**.....pág29.

3. **OBJETIVOS**.....pág29.

**MATERIAL Y MÉTODOS**.....pág30.

1. **SUJETOS DE ESTUDIO**.....pág30.

2. **OBTENCIÓN DE MUESTRAS**.....pág30.

3. **BIOLOGÍA MOLECULAR**.....pág31.

3.1 Extracción de ARN (ácido ribonucleico) .....pág31.

3.2 Calidad de la muestra .....pág32.

3.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc). Transcripción inversa (RT).....pág32.

3.4 Calidad del ADNc.....pág33.

3.5 Protocolos de PCR a tiempo real.....pág33.

3.5.1. Detección de la expresión génica.....pág33.

Volumen final de PCR.....pág34.

<b>Protocolo de amplificación</b> .....	pág34.
<b>Protocolo de melting</b> .....	pág35.
<b>Termociclador</b> .....	pág35.
<b>3.5.2. Eficiencias, Coeficiencias y T<sup>as</sup> de Melting</b> .....	pág35.
<b>3.5.3. Normalización</b> .....	pág37.
<b>3.5.4. Cálculo de la expresión génica</b> .....	pág37.
<b>RESULTADOS</b> .....	pág38.
<u><b>1. Resultados generales</b></u> .....	pág38.
<u><b>2. Resultados específicos de cada gen.</b></u> .....	pág39.
<b>2.1. Gen <i>Clock</i></b> .....	pág39.
<b>2.2. Gen <i>Cry</i></b> .....	pág40.
<b>2.3. Gen <i>Per</i></b> .....	pág41.
<b>DISCUSIÓN</b> .....	pág42.
<b>CONCLUSIONES</b> .....	pág46.
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	pág47.



# Índice Figuras

Fig. 1: Placenta: Aspecto Macroscópico.

Fig. 2: Placenta: Cara materna y cara fetal.

Fig. 3: Placenta: Estructura y Membranas.

Fig. 4: Placenta: Funciones principales.

Fig. 5: Algunas de las Funciones reguladas por el sistema Circadiano.

Fig. 6: Reloj central: Entradas y Salidas.

Fig. 7: Genes reloj, mantienen y generan los ritmos circadianos.

Fig. 8: Interacción entre los diversos genes a lo largo del día circadiano. Bases moleculares están muy conservadas (Mi Shi y Xiangzhong Zheng, 2013).

Fig. 9: Interacción reloj circadiano principal - osciladores periféricos en relación con el metabolismo (Modificada de Mi Shi y Xiangzhong Zheng, 2013).

Fig. 10: Ejemplo de interacción entre el reloj central y algunos órganos periféricos.

Fig. 11: Relación entre el reloj circadiano y el ciclo estral.

Fig. 12: Ciclo menstrual, humanos.

Fig. 13: Interacción entre el ambiente y el tracto reproductor femenino (Modificado de Kennaway, 2005).

Fig. 14: Ritmo circadiano no patológico.

Fig. 15: Trastornos del ritmo circadiano del sueño (Silva, F., 2010).

Fig. 16: Ritmos metabólicos. [jorlab.blogspot.com](http://jorlab.blogspot.com).

Fig. 17: El ritmo circadiano y riñón: excreción urinaria de sodio (Modificada de Firsov y cols., 2012).

Fig. 18: Fases de fecundación e implantación en humanos.

Fig. 19: Sistema circadiano fetal y su interacción con el ritmo circadiano materno (Serón-Ferré y cols., 2012).

Fig. 20: Recién nacido.

Fig. 21: Tiempos Circadianos.

Fig. 22: Protocolo de la PCR.

Fig. 23: PCR: Tmelting del gen *Clock*.

Fig. 24: PCR: Tmelting del gen *Cry1*.

Fig. 25: PCR: Tmelting del gen *Per2*.

Fig. 26: PCR: amplificación del gen *Clock*.

Fig. 27: PCR: amplificación del gen *Cry1*.

Fig. 28: PCR: amplificación del gen *Per2*.

Fig. 29: Nivel de expresión relativa del gen reloj *Clock* en los diferentes TC elegidos.

Fig. 30: Nivel de expresión relativa del gen reloj *Cry1* en los diferentes TC elegidos.

Fig. 31: Nivel de expresión relativa del gen reloj *Per2* en los diferentes TC elegidos.

# Índice Tablas

Tabla 1: Genes Humanos *Per1*, *Per2* y *Per3*.

Tabla 2: Genes Humanos y de Ratón *Cry1* y *Cry2*.

Tabla 3: Genes Humanos y de Ratón *Clock*.

Tabla 4: Gen Humano y de Ratón *Bmal1*.

Tabla 5: Secuencia de los cebadores utilizados, peso molecular, temperatura de *Melting* y temperatura de hibridación.

# INTRODUCCIÓN

## 1. PLACENTA

La placenta es un órgano de estructura muy compleja, está muy especializado, ya que sirve de conexión entre la madre y el feto desde la implantación hasta su separación definitiva tras el alumbramiento.

### **1.1. Desarrollo y estructura.**

En su desarrollo diferenciamos dos períodos de duración muy distinta: período prevelloso y período velloso.

. Período prevelloso: Este período se extiende desde el día 10 u 11 a partir de la ovulación, tras producirse la implantación, hasta el día 13 postovulatorio.

. Período velloso: Comienza tras el día 13. A partir del cuarto mes la placenta ya tiene su estructura definitiva. Desde este momento hasta el final del embarazo, la placenta crece más o menos, pero no modifica su morfología.

### **1.2. Aspecto macroscópico de la placenta madura.**

La placenta madura, al final del embarazo, se asemeja a una torta (Fig.1).



*Fig 1: Placenta: Aspecto Macroscópico.*

Sus dimensiones, por término medio, se encuentran entre 13 y 20 cm de diámetro, y entre 2 y 6 cm de espesor. Su peso oscila entre 500 y 600 gramos. La relación entre el peso de la placenta y del feto es, aproximadamente, de 1/5 a 1/6.

Por una de sus caras la placenta se adhiere al útero; por ello, se le denomina cara uterina o materna. Frecuentemente sobre esta cara se aprecia un coágulo sanguíneo más o menos extenso (Fig.2).

La otra cara se denomina cara fetal, por estar orientada hacia la cavidad amniótica. Su superficie es lisa, brillante y de color gris azulado. Está recubierta por una membrana delgada, denominada amnios, a través de la cual se transparentan una serie de vasos que proceden del cordón umbilical (Fig.2).

En el centro de esta cara, raras veces hacia la periferia, se inserta el cordón umbilical (fig.2), que une la placenta con el feto (Gonzalez-Merlo y Escudero, 1995).

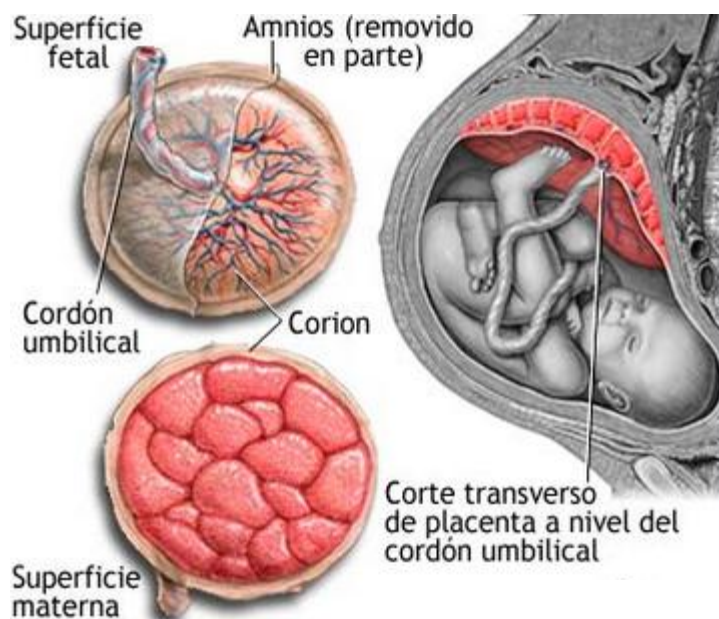


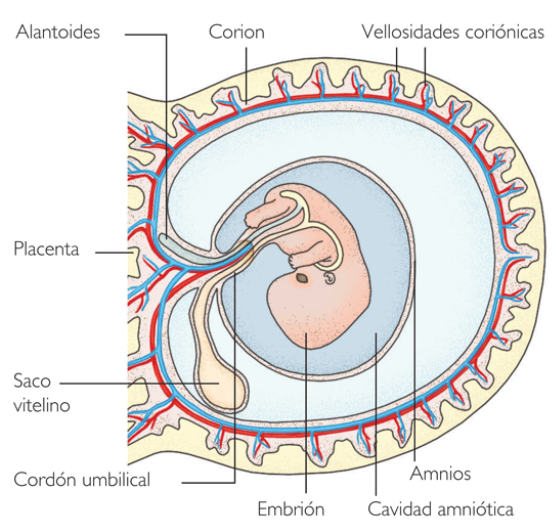
Fig 2: Placenta: Cara materna y cara fetal.

### 1.3. Membranas fetales.

En condiciones normales, las membranas fetales revisten la cavidad uterina y rodean por completo al feto (Fig.3). Las células que forman el corion están presentes poco después de la formación del blastocito, mientras las del amnios aparecen en la

superficie dorsal del embrión formado entre los días séptimo y octavo. Por tanto, su origen anatómico es diferente. El crecimiento de las membranas, que se aprecia por actividad mitótica, continúa casi hasta la semana 28, después el crecimiento del saco tiene lugar por estiramiento.

En general, las dos membranas pueden deslizarse una respecto a otra, y se separan con facilidad en el momento del alumbramiento. La superficie interna del amnios es lisa, resbalosa y reviste por completo al corion, placa placentaria y cordón umbilical. La capa compacta del amnios y la reticular del corion son las que le confieren resistencia. Las membranas tienen una función decisiva en el desarrollo y en la protección del feto a lo largo de la gestación (De Lia, 1994).



*Fig3: Placenta: Estructura y Membranas.*

#### **1.4. Funciones.**

La multiplicidad de las funciones placentarias la convierte en un órgano complejo (Fig.4). Tres de esas funciones son básicas: Función de transporte e intercambio, pues la circulación fetal y la circulación materna establecen relaciones muy íntimas, que permiten el intercambio de gases y sustancias nutritivas; Función de barrera; y además, tiene actividad metabólica y endocrina, que contribuye de forma decisiva al mantenimiento de la gestación (Fortuny y González Gómez, 1995).



*Fig 4: Placenta: Funciones principales.*

#### **1.4.1. Barrera.**

El concepto de la placenta como una barrera física al paso de sustancias se basa en la interposición de distintas membranas entre la sangre materna, que alcanza el espacio intervilloso, y la sangre, que circula por el capilar fetal vellosa.

Tales membranas son: pared del capilar vellositario, mesénquima de la vellosidad, citotrofoblasto, sincitiotrofoblasto y membrana basal del trofoblasto.

Como barrera protectora tiene dos funciones clave: evitar el paso de infecciones y que el aloinjerto, en este momento es el feto, sea rechazado. Este aloinjerto desafía las leyes de la inmunología, pues si el embrión y la madre son genéticamente similares el riesgo de aborto es mayor, pero si son muy diferentes antigénicamente la probabilidad de supervivencia es mayor.

La efectividad de la barrera, sin embargo, no es completa en lo que se refiere al paso de sustancias determinadas. Un ejemplo de esto es el paso de hematíes del feto a la madre, y que, en caso de incompatibilidad antigénica, conducen a la sensibilización materna. El paso de tales sustancias se atribuye a la rotura, en algunas zonas, de la continuidad de esta membrana, lo que se considera más un defecto de la membrana que una modificación estructural con base fisiológica.

### **1.4.2. Transporte e intercambio.**

Una de las funciones esenciales de la placenta es permitir el paso de oxígeno y sustancias nutritivas (agua, electrolitos, hidratos de carbono, lípidos, aminoácidos, proteínas, bilirrubina y vitaminas) de la madre al feto, así como a la inversa, el paso de productos catabólicos del feto a la madre. Por ello se considera que ésta funciona como órgano excretor, con un papel similar al del aparato renal.

Este intercambio puede realizarse a través de los siguientes mecanismos: difusión simple, difusión facilitada, transporte activo, pinocitosis, o paso directo gracias a la continuidad de la membrana placentaria.

### **1.4.3. Endocrina.**

Desde las fases iniciales de su desarrollo, la placenta produce cantidades considerables de hormonas tanto proteicas como esteroideas. Esta gran capacidad de síntesis sugiere que las hormonas desempeñan un papel importante en mantener la gestación y en favorecer el crecimiento y el desarrollo fetal.

La función endocrina no puede ser considerada de manera aislada en este órgano, sino que debe entenderse, en algunos aspectos de su biosíntesis hormonal, como una unidad funcional entre el feto y la madre. La madre participa en dos aspectos: proporciona sustratos para la biosíntesis, y una vez completada ésta, sirve en la función excretora, eliminando las secreciones hormonales fetoplacentarias.

## **2. SISTEMA CIRCADIANO.**

El significado etimológico de ritmo circadiano, “circadian”, proviene de dos palabras latinas: “circa” y “diem”. En biología este término se aplica a eventos fisiológicos que ocurren cíclicamente en un período aproximado de 24 horas, “en torno al día” (Fig.5). El ritmo circadiano más obvio es el que responde a la alternancia día-noche. Los organismos vivos no sólo responden al ambiente sino que también generan sus propios ritmos biológicos aún en ausencia de señales externas, se dice por tanto que los ritmos tienen carácter endógeno y se mantienen en condiciones ambientales constantes, es decir, persisten aún sin estímulos externos ambientales como la luz, el



alimento o la temperatura, y están determinados genéticamente (en mamíferos se conocen varios genes implicados). Se generan en tejidos que actúan como auténticos relojes cuya acción es independiente del ambiente, aunque cualquier ritmo trata de sincronizarse con él. Estos ritmos permiten a los organismos actuar de manera eficaz ante las fluctuaciones ambientales externas, anticipándose a ellas, lo que confiere una ventaja adaptativa pues memoriza el tiempo en el cerebro y puede predecir los cambios en la naturaleza (Golombek y Yannielli, 2006).

### ESQUEMA DE CICLO CIRCADIANO

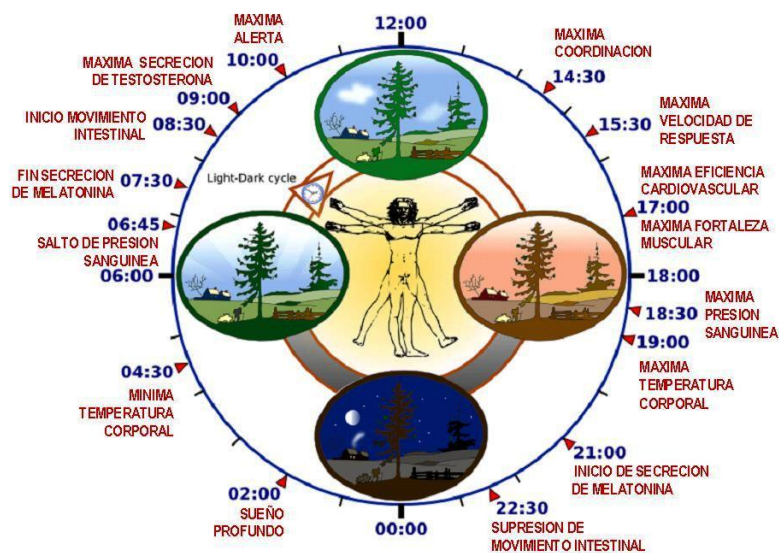


Fig 5: Algunas de las Funciones reguladas por el sistema Circadiano.

## 3. COMPONENTES DEL SISTEMA CIRCADIANO.

### 3.1. Reloj central. Entradas y salidas.

Los ritmos son generados por un reloj biológico central o principal y varios relojes osciladores periféricos.

El principal reloj biológico se encuentra en el sistema nervioso central (SNC), concretamente en el núcleo supraquiasmático (NSQ) hipotalámico.

El NSQ se sincroniza con factores ambientales, entre ellos el ciclo luz oscuridad (LO), la temperatura, y la disponibilidad de alimento, y controla los ritmos fisiológicos y del comportamiento del organismo (De la Iglesia, 2006).

La sincronización del NSQ con el ciclo LO tiene lugar a través de una vía nerviosa que se inicia en las células ganglionares de la retina y conduce los impulsos nerviosos a través del tracto retino-hipotalámico hasta el NSQ (Fig.6). En mamíferos, las únicas células fotorreceptoras capaces de transmitir información fótica al cerebro se encuentran en el ojo. Las células osciladoras del NSQ deben sincronizarse por vías aferentes que se originan en la retina.

El principal neurotransmisor responsable de la sincronización fótica del NSQ es glutamato, que se libera en los terminales del haz retinohipotalámico. Desde este núcleo hipotalámico la vía continúa hacia la glándula pineal (Borjigin y cols., 2011) de forma que desde el NSQ, las fibras nerviosas proyectan hacia el área tubero-medial del hipotálamo lateral donde sinapsan con neuronas cuyas fibras descienden a través del tallo cerebral hasta alcanzar el ganglio cervical superior (GCS). Las fibras postganglionares finalizan en la glándula pineal, que a partir de la información recibida envía una señal hormonal, secretando melatonina, al NSQ para que actúe como un reloj biológico.

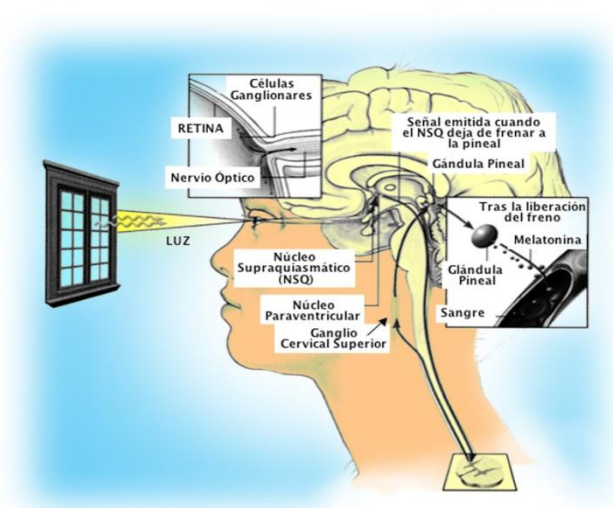


Fig 6: Reloj central: Entradas y Salidas.

### 3.2. Componentes moleculares del NSQ: Genes reloj.

Diversos estudios, llevados a cabo inicialmente en *Drosophila*, permitieron caracterizar mutaciones que demostraron la expresión de genes implicados en la generación y mantenimiento de los ritmos circadianos, a los cuales se les denominó “genes reloj” (Fig.7). Más tarde, se descubrieron genes homólogos en ratones y otros mamíferos, identificando así nuevos genes reloj a partir de hámsteres o ratones mutantes (1997a, 1997b).

Hasta la actualidad se han descrito, en mamíferos, 9 genes reloj: *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Clock*, *Bmal1*, *Rev-Erb* (Rev-ErbA alpha), y *Ck1e* (caseína cinasa Ie).

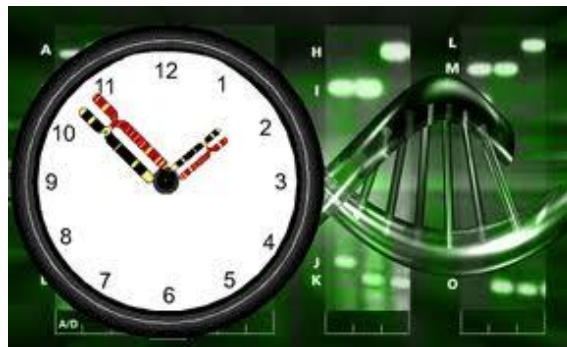


Fig 7: Genes reloj, mantienen y generan los ritmos circadianos.

### 3.3 Principales genes reloj.

#### 3.3.1. Gen *Per*.

El gen Period (*Per*) es un gen localizado en el cromosoma X de *Drosophila melanogaster*. Fue aislado por Konopka y Benzer en 1971, tras obtener un mutágeno usando EMS (Ethyl methanesulfonato:  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{C}_2\text{H}_5$ ), y se secuenció en 1984 (Reddy y cols.). En 1998 se descubrió que *Per* origina, tras sufrir el proceso postranscripcional de un intrón, dos transcritos diferentes, y que ambos codifican la proteína PER (Cheng y cols., 1998).

Por su parte, Tei y cols (1997) identificaron estos genes en ratón y en humanos denominándolos *mPer* y *hPer* respectivamente. En mamíferos, se conocen 3 genes homólogos tipo *Per*: *Per1* (Cromosoma 17p12), *Per2* (crom.2q37.3) y *Per3* (crom.1p36.23) (Tabla1). Estos muestran una secuencia aminoacídica similar a la

observada en *Drosophila*. Mientras la proteína PER en moscas se expresa tanto en núcleo como en el citoplasma, en humanos su expresión está más restringida: mPer1 se localiza en el núcleo y mPer2 en el citoplasma (Vielhaber y cols., 2000).

Estudios con tres líneas de ratas knockout para el gen *Per1* (Albrecht y cols., 2001; Cermakian y cols., 2001; y Bae y Weaver, 2003) han puesto de manifiesto, tras observar el ritmo de actividad, que aparentemente el comportamiento de los ratones no varía. En dos de esas líneas mutantes los ratones responden a los pulsos de luz tanto por la mañana como por la tarde, cuando se les mantiene en constante oscuridad. La línea restante no responde a los pulsos de luz diurnos (Albrecht y cols., 2001).

Las dos líneas mutantes desarrolladas para el gen *Per2* (Zheng y cols., 1999, Bae y Weaver., 2003) también muestran aparente normalidad. Una de esas líneas responde a pulsos diurnos de luz, pero no a los nocturnos (Albrecht, 2001). La otra, sin embargo, reaccionaba bien a pulsos de luz tanto diurnos como nocturnos.

El ratón mutante para el gen *Per3* muestra pequeños cambios en el comportamiento rítmico cuando se le somete a constante oscuridad. Su periodo de actividad tan sólo se reduce en 0.5 horas, lo que sugiere que no es uno de los componentes fundamentales de los ritmos circadianos.

Cuando se producen ratones knockout tanto para el gen *Per1* como para el *Per2*, y se les mantiene en constante oscuridad, estos pierden inmediatamente el ritmo circadiano. Por tanto, se confirma que la pérdida de un gen o el defecto en su expresión se compensa con el otro gen.

period homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )		period homolog 2 ( <i>Drosophila</i> )		period homolog 3 ( <i>Drosophila</i> )	
Identifiers		Identifiers		Identifiers	
Symbol	PER1	Symbol	PER2	Symbol	PER3
Entrez	5187 <a href="#">↗</a>	Entrez	8864 <a href="#">↗</a>	Entrez	8863 <a href="#">↗</a>
HUGO	8845 <a href="#">↗</a>	HUGO	8846 <a href="#">↗</a>	HUGO	8847 <a href="#">↗</a>
OMIM	602260 <a href="#">↗</a>	OMIM	603426 <a href="#">↗</a>	OMIM	603427 <a href="#">↗</a>
RefSeq	NM_002616 <a href="#">↗</a>	RefSeq	NM_003894 <a href="#">↗</a>	RefSeq	NM_016831 <a href="#">↗</a>
UniProt	O15534 <a href="#">↗</a>	UniProt	O15055 <a href="#">↗</a>	UniProt	P56645 <a href="#">↗</a>
Other data		Other data		Other data	
Locus	Chr. 17 p12 <a href="#">↗</a>	Locus	Chr. 2 q37.3 <a href="#">↗</a>	Locus	Chr. 1 p36.23 <a href="#">↗</a>

Tabla 1: Genes Humanos *Per1*, *Per2* y *Per3*.

### 3.3.2. Gen *Cry*.

El diminutivo *Cry* procede la palabra criptocromo. Este es un tipo de flavoproteína que responde a la luz azul, y que se encuentra tanto en animales como en plantas. Varios estudios sugieren que el criptocromo juega un papel destacado en la generación y el mantenimiento de los ritmos circadianos en los seres vivos (Klarsfeld y cols., 2004), ya que *Cry* en moscas actúa como un fotorreceptor que modula la entrada de luz hacia el reloj central (Emery y cols., 2000), y en mamíferos actúa como represor de la transcripción (Reppert y Weaver, 2002).

En 1996 Todo y cols., identificaron el gen *Cry* en *Drosophila*. En 1998 se descubrió en ratón (Kobayashi y cols.).

Se conocen dos tipos de genes *Cry* en humanos (Tabla2): *Cry1* (crom.12q23-q24.1) y *Cry2* (crom.11p11.2) (Griffin y cols., 1999), que codifican respectivamente para producir las proteínas criptocromas CRY1 y CRY2 (Van der Spek y cols., 1996).

Ratones mutantes para el gen *Cry1*, mantenidos en constante oscuridad, muestran un retraso de fase, y una menor expresión de *Per1* en respuesta a la luz por parte del NSQ (Vitaterna y cols., 1999). Sin embargo, la expresión de *Per2* no se ve afectada por la pérdida de *Cry1*, y los ratones aún muestran oscilaciones diarias de *Per1* y *Per2* sin influencia del NSQ.

En los mutantes para *Cry2* en constante oscuridad, la fase de actividad se alarga hasta las 25 horas aproximadamente. Con pulsos de luz se reduce la expresión de *Per1*, pero en condiciones de luz intensa muestra una fase de mayor duración que el genotipo salvaje (Thresher y cols., 1998). Estos mutantes, en condiciones normales, mantienen la ritmicidad de *Per1* y *Per2* sin la influencia del NSQ.

La pérdida conjunta de ambos genes, *Cry1* y *Cry2*, conlleva una total pérdida del ritmo (Van der Horst y cols., 1999), lo que sugiere que entre ellos se compensa su función. También muestran, en el SNC, pérdida de la expresión rítmica del mRNA *Per1*, ya que no responde a los pulsos de luz. La expresión de varios genes involucrados en diversas funciones, como el metabolismo, la señalización celular, el sistema inmune y los factores de transcripción, se ve alterada (Oishi y cols., 2003).

Tras varias investigaciones se ha visto que las consecuencias de combinar múltiples mutantes para los genes *Per* y *Cry* son las mismas ya observadas en animales knockout para un único gen (Oster y cols., 2002, 2003).

Cryptochrome 1 (photolyase-like)			Cryptochrome 2 (photolyase-like)		
Identifiers			Identifiers		
<b>Symbols</b>	CRY1; PHL1		<b>Symbols</b>	CRY2; HCRY2; PHL2	
<b>External IDs</b>	OMIM: 601933 MGI: 1270841		<b>External IDs</b>	OMIM: 603732 MGI: 1270859	
<b>IDs</b>	HomoloGene: 7042 GeneCards: CRY1 Gene		<b>IDs</b>	HomoloGene: 56466 GeneCards: CRY2 Gene	

Orthologs			Orthologs		
Species	Human	Mouse	Species	Human	Mouse
<b>Entrez</b>	1407	12952	<b>Entrez</b>	1408	12953
<b>Ensembl</b>	ENSG00000008405	ENSMUSG00000020038	<b>Ensembl</b>	ENSG00000121671	ENSMUSG00000068742
<b>UniProt</b>	Q16526	P97784	<b>UniProt</b>	Q49AN0	Q9R194
<b>RefSeq (mRNA)</b>	NM_004075	NM_007771	<b>RefSeq (mRNA)</b>	NM_001127457	NM_001113333
<b>RefSeq (protein)</b>	NP_004066	NP_031797	<b>RefSeq (protein)</b>	NP_001120929	NP_001106804
<b>Location (UCSC)</b>	Chr 12: 107.39 – 107.49 Mb	Chr 10: 85.13 – 85.19 Mb	<b>Location (UCSC)</b>	Chr 11: 45.87 – 45.9 Mb	Chr 2: 92.4 – 92.43 Mb

Tabla 2: Genes Humanos y de Ratón *Cry1* y *Cry2*.

### 3.3.3. Gen *Clock*.

El gen *Clock* (siglas en inglés "*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*") codifica una proteína implicada en la regulación de los ritmos circadianos. En ratón fue identificado por King y cols., (1997b). En humanos se encuentra en el cromosoma 4q12 (Tabla3). La proteína CLOCK parece afectar tanto la persistencia como a la duración de los ciclos circadianos (Gekakis y cols., 1998).

Los ratones Knockout se generaron usando el potente mutágeno ENU (N-ethyl-N-nitrosourea . C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>). Al cambiar una Alanina por una Timina se escinde el exón 19, y con ello se pierden 51 aminoácidos de la región carboxilo terminal (King y cols., 1997a, 1997b). La proteína mutada CLOCK( $\Delta$ 19) no funciona de manera correcta, es capaz de formar un dímero con BMAL1 y unirse a los reguladores de la caja E, pero no es capaz de llevar a cabo la transcripción (Gekakis y cols., 1998).

Los ratones mutantes se entrenan en ciclos LO, y muestran elevada actividad en el período de luz. Cuando se les somete a total oscuridad, su ritmicidad persiste durante 26-27 horas, aunque muchos de ellos se vuelven arrítmicos. Esta falta de ritmo también se observa en el hígado, el corazón, el riñón, y el músculo (Oishi y cols., 2000, Noshiro y cols., 2005). Estudios llevados a cabo con *microarrays* muestran que un amplio rango de genes controlados por *Clock* están dañados, o su función se ve interrumpida, en los tejidos periféricos (Oishi y cols., 2003).

Clock circadian regulator		
Identifiers		
Symbols	CLOCK; KAT13D; bHLHe8	
External IDs	OMIM: 601851 MGI: 99698 HomoloGene: 3603 GeneCards: CLOCK Gene	
Orthologs		
Species	Human	Mouse
Entrez	9575	12753
Ensembl	ENSG00000134852	ENSMUSG00000029238
UniProt	O15516	O08785
RefSeq (mRNA)	NM_001267843	NM_007715
RefSeq (protein)	NP_001254772	NP_031741
Location (UCSC)	Chr 4: 56.29 – 56.41 Mb	Chr 5: 76.21 – 76.3 Mb

Tabla 3: Genes Humanos y de Ratón *Clock*.

### 3.3.4. Gen *Bmal1*.

El gen “Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like” o *Arntl*, más conocido por *Bmal1*, codifica para un factor de transcripción, y está relacionado con el ritmo circadiano.

En mamíferos fue identificado en 1997, por dos grupos de científicos: Hogenesch y cols. en Marzo, y Ikeda y Nomura en Abril. Sin embargo, que su papel es fundamental en los ritmos circadianos, no fue descubierto hasta que se generaron ratones knockout. Estos presentaban una pérdida completa del ritmo en la locomoción y en otros procesos como la alteración del sueño (Laposky y cols., 2005). También mostraban una expresión reducida y alterada de los genes *Per1* y *Per2* en el SNC.

La importancia de este gen reside en que por sí solo es el único gen reloj imprescindible para generar ritmos circadianos. (Bunger y cols., 2000).

En humanos, el gen *Bmal1* está localizado en el cromosoma 11p15 (Tabla 4).

Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like		
Identifiers		
<b>Symbols</b>	ARNTL; BMAL1; BMAL1c; JAP3; MOP3; PASD3; TIC; bHLHe5	
<b>External IDs</b>	OMIM: 602550 MGI: 1096381 HomoloGene: 910 GeneCards: ARNTL Gene	
Orthologs		
<b>Species</b>	<b>Human</b>	<b>Mouse</b>
<b>Entrez</b>	406	11865
<b>Ensembl</b>	ENSG00000133794	ENSMUSG00000055116
<b>UniProt</b>	O00327	Q9WTL8
<b>RefSeq (mRNA)</b>	NM_001030272	NM_001243048
<b>RefSeq (protein)</b>	NP_001025443	NP_001229977
<b>Location (UCSC)</b>	Chr 11: 13.3 – 13.41 Mb	Chr 7: 113.21 – 113.31 Mb

Tabla 4: Gen Humano y de Ratón *Bmal1*.

### 3.4. Activación/inactivación de genes reloj.

El mecanismo molecular del NSQ y sus osciladores periféricos circadianos depende de la interacción de señales tanto positivas como negativas, que regulan la transcripción rítmica de los genes reloj. Las señales activadoras positivas dependen de los genes *Clock* y *Bmal1*, mientras que las negativas dependen de los genes *Per* y *Cry* (Fig.8). A lo largo del día circadiano estas señales funcionan como se describe a continuación.

Al inicio del día circadiano los heterodímeros que forman las proteínas CLOCK:BMAL1 se unen a secuencias reguladoras llamadas cajas E, localizadas en los promotores de los genes *Per* y *Cry*, activando la transcripción de dichos genes. Los mensajeros son traducidos a proteínas PER y CRY en el citosol.

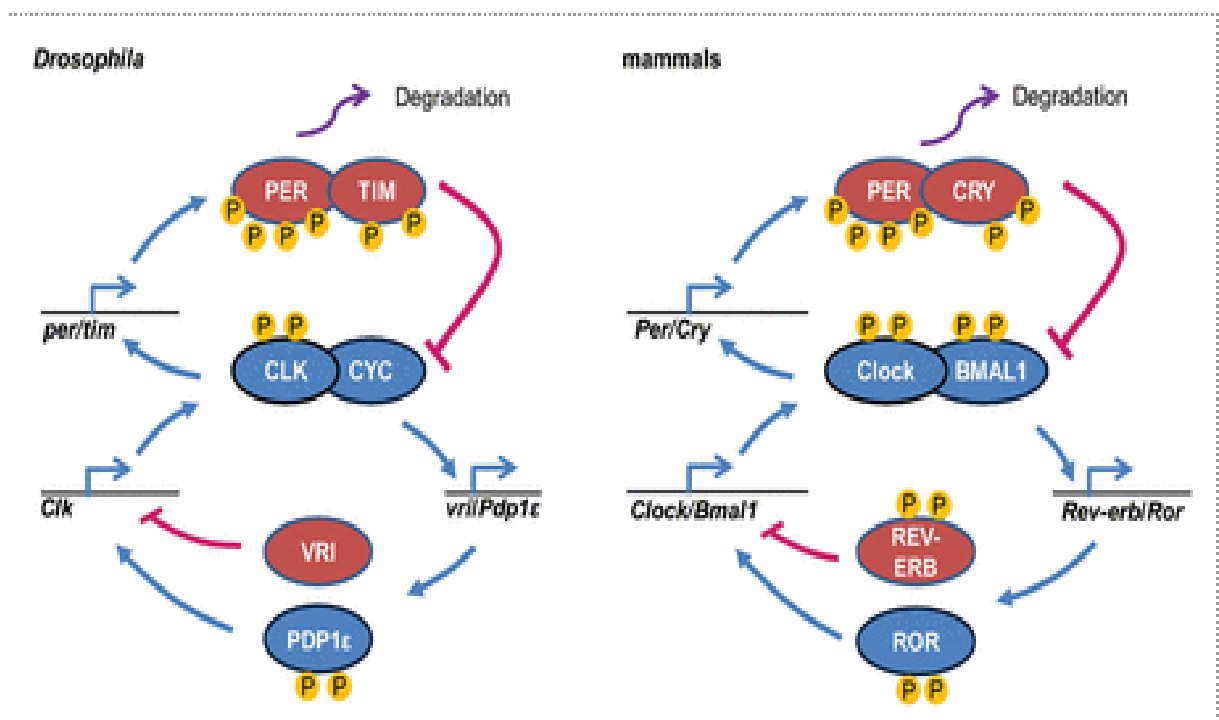
A mitad del día circadiano las proteínas PER y CRY se asocian en heterodímeros (PER:CRY). Las enzimas CKI (casein quinasa I) los fosforilan, y son translocados al



núcleo, donde se acumulan y secuestran a los heterodímeros CLOCK:BMAL1. Ahora estos no se pueden unir al promotor de *Per* y *Cry*, inactivando así su transcripción. Por ello se dice que las proteínas *Per* y *Cry* actúan como reguladores negativos (Hastings y cols., 2007).

El hecho de que los genes reloj se encuentren tan conservados entre diferentes especies, incluyendo al humano, y que no haya pruebas al contrario, hacen pensar que estos deben tener alguna función importante.

Los estudios actuales tratan de descubrir su función en cada tejido y profundizar en el conocimiento sobre las consecuencias de la desincronización en su patrón rítmico de expresión (Kennaway, 2004).



*Fig 8:* La figura representa las interacciones entre los diversos genes a lo largo del día circadiano. También refleja que las bases moleculares están muy conservadas entre *Drosophila* y Mamíferos. Shi y Zheng, 2013.

### 3.5. Relojes periféricos.

Actualmente sabemos que además del NSQ, otros muchos órganos, tanto centrales como periféricos, se comportan como relojes biológicos, son los relojes secundarios, cuya actividad está regulada por el reloj principal (Fig.9).

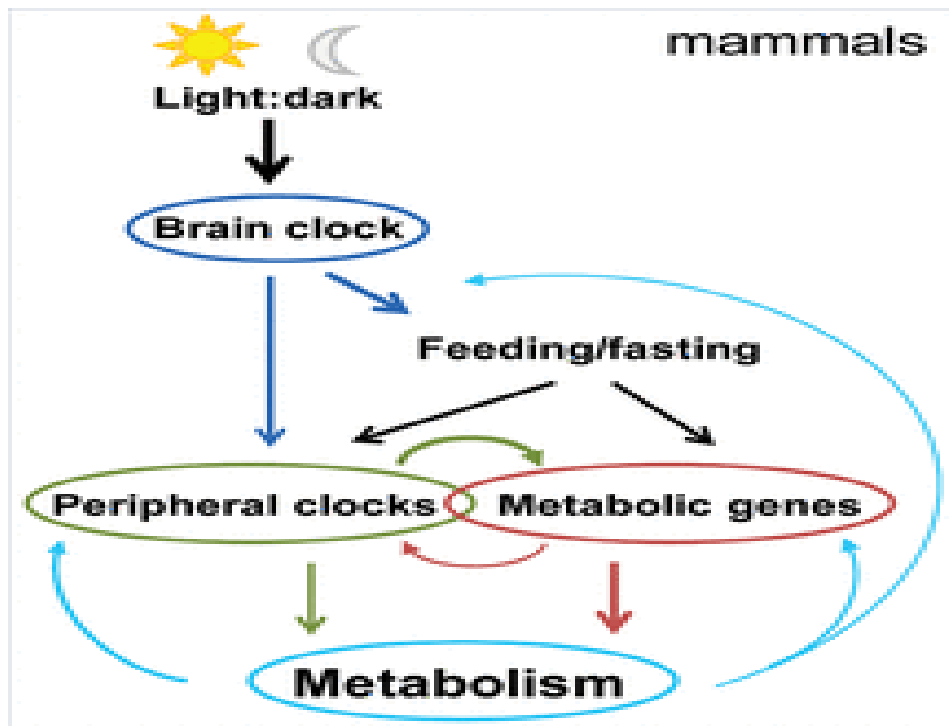


Fig 9: Interacción entre el reloj circadiano principal y los osciladores periféricos. Es un ejemplo relacionado con el metabolismo. Modificada de Shi y Zheng, 2013.

El conocimiento de los genes reloj en el NSQ supuso un importante avance, ya que hizo pensar que varios tejidos no nerviosos (esófago, pulmones, hígado, bazo, timo, células sanguíneas, células dérmicas, glándula suprarrenal, etc) también podían expresar rítmicamente estos genes, y se les comenzó a considerar relojes circadianos (Fig.10).

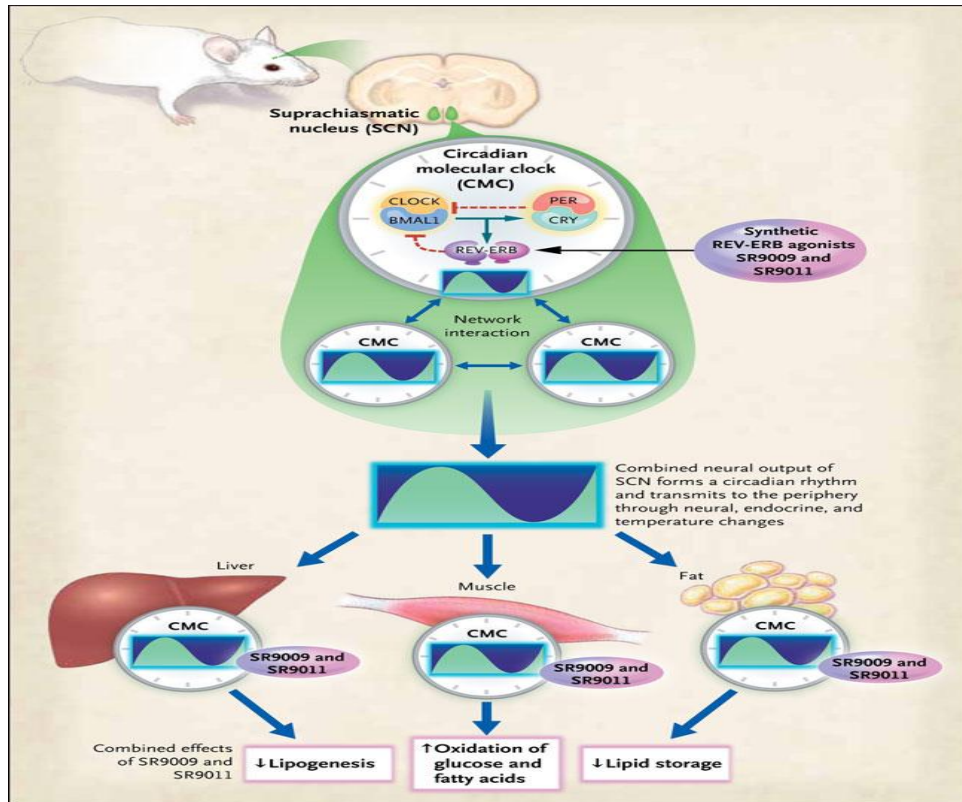


Fig 10: Interacción entre el reloj central y algunos órganos periféricos como el hígado, el músculo y el tejido adiposo.

El primer órgano periférico en el que se demostró la expresión de genes reloj fue el hígado. Se determinó que bajo condiciones de sincronización por el alimento, este ajusta sus funciones energéticas a los ciclos de alimentación, y además, es capaz de anticipar la llegada del alimento, para lo cual acumula adenosín trifosfato (ATP) a pesar de las horas de ayuno que transcurren entre cada alimentación (Davidson y cols., 2004).

Más tarde, usando ratas transgénicas que expresan el gen *Per* asociado al gen de la luciferasa, se demostró que el pulmón, el páncreas, el músculo esquelético y el hígado, todos ellos en cultivo muestran, en un periodo aproximado de 24 horas, oscilaciones en la expresión del propio gen, aunque estas se van atenuando y casi desaparecen a los 5 días. (Escobar y cols., 2006).

Todos los osciladores periféricos están sincronizados a través de vías endocrinas, que dependen del NSQ, incluyendo señales rítmicas vía glucocorticoides. (Dickmeis y cols., 2009; Waddell y cols., 2012).

### 3.5.1. Relojes periféricos y reproducción.

Hay estudios que relacionan reloj circadiano, glándula tiroidea, eje hipotálamo-hipófisis, y reproducción estacional (Fig.11) (Ikegami y Yoshimura, 2012; Tonsfeldt y Chappell, 2012).

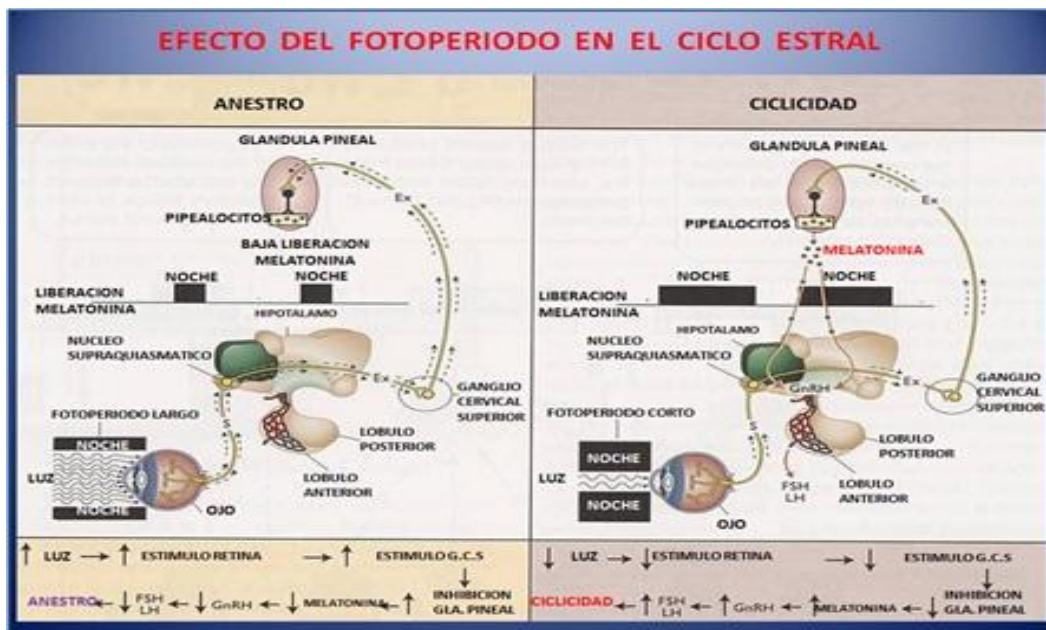
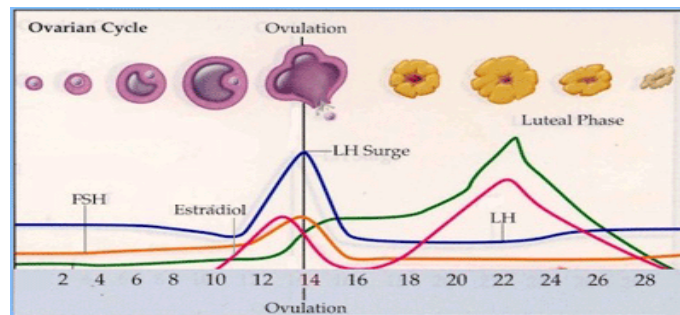


Fig 11: Relación entre el reloj circadiano y el ciclo estral.

Las neuronas GnRH (hormona liberadora de gonadotropina), in vitro, mantienen la ritmicidad en sus pulsos de secreción, a la vez que la de todos los genes reloj (Chappell y cols., 2003; Gillespie y cols., 2003; Olcese y cols., 2003). Si estas células se transfectan con células mutantes para *clock*, se ve que los pulsos de GnRH ahora reducen su frecuencia. En cambio si se sobreexpresa *Cry1*, aumenta la amplitud del pulso de GnRH sin variar su frecuencia (Chappell y cols., 2003). Esto sugiere que, en roedores, el NSQ además de marcar el ritmo endógeno, tiene un papel fundamental sobre la expresión de los picos de LH (hormona luteinizante)..

En humanos la relación entre ritmo circadiano, picos de LH y la ovulación no es muy evidente, pero se estima que el pico de LH (Fig 12) en las mujeres sucede entre media noche y las 08:00 horas (Cahill y cols., 1998; Kerdelhue y cols., 2000). 24 h, 36 h o 48 horas después, ocurre la ovulación (Vermesh, 1987; Wilcox y cols., 1995).



*Fig 12: Ciclo menstrual, humanos.*

Los ritmos circadianos se relacionan estrechamente con la capacidad reproductora, ya que colaboran en la sincronización de la ovulación o en la receptividad para copular (Kennaway y cols., 2005).

En roedores nocturnos, el comportamiento de las hembras estimula a los machos para que copulen a media noche; se sincroniza la copula con la ovulación. Retrasar esta copula, o inseminar 4-6 horas tras la ovulación, puede provocar que el embrión sea inviable (Sakai y Endo., 1988). En humanos, hay un fuerte componente circadiano que se refleja en un pico de máxima actividad sexual por la noche y un pico de mínima actividad a primeras horas de la mañana. A pesar de esto, los humanos somos los únicos que copulan a lo largo de todo el ciclo de la mujer. Las mujeres tienen mayor número de días fértiles que la rata, estos comienzan 3-6 días antes de la ovulación y terminan con la ovulación, período en el que el moco cervical cambia de apariencia para formar una barrera contra los espermatozoides. Por las peculiaridades del ser humano es difícil saber si la baja fertilidad de nuestra especie, al compararla con otras, se debe al inapropiado momento de la fertilización tras la copula o a otros factores.

Por todo ello, no sorprende la relación entre la expresión de genes reloj y la reproducción (Fig.13). De hecho, se han identificado estos genes en diversos tejidos implicados en la reproducción como el útero (Johnson y cols., 2002), el oviducto (Kennaway y cols., 2003), el ovario, los ovocitos, etc. Estos expresan genes reloj rítmicos, que responden a las gonadotropinas (kennaway y cols., 2012a). Hay evidencias de que los ritmos circadianos son los responsables del desencadenamiento de la ovulación, y esto ha sido probado en modelos animales, pero hay muy pocos estudios llevados a cabo en humanos (kennaway., 2005).

En ratas, la placenta expresa genes reloj (Wharfe y cols., 2011). Frigato y cols. (2009) aíslan células de la placenta humana, y en ella identifican la expresión rítmica de los genes reloj. Sin embargo, por el momento no hay conocimiento de esta expresión rítmica de los genes reloj en tejido placentario humano. Se necesitan nuevos estudios que revelen si en humanos se expresan esos genes, su implicación a lo largo de la gestación y también es importante comparar su función entre diversas especies (Waddell., 2012).



*Fig 13:* Interacción entre el ambiente y el tracto reproductor femenino. La ritmicidad en cada nivel asegura un desarrollo embrionario óptimo. Modificado de Kennaway, 2005.

#### **4. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN RÍTMICA DE LOS GENES.**

La expresión rítmica de los genes reloj regula tanto procesos fisiológicos como determinados aspectos del comportamiento. En consecuencia, la desincronización circadiana o la alteración en la expresión rítmica del patrón circadiano de los genes reloj, está hoy en día ampliamente relacionada con el origen de determinadas patologías.

Un claro ejemplo de las consecuencias de la desincronización circadiana sobre el organismo son las alteraciones del sueño (Fig.14). Morris y cols. (2012) relacionan dichas alteraciones con la regulación de hormonas como la melatonina, el cortisol, la prolactina, la hormona de crecimiento y las hormonas tiroideas.

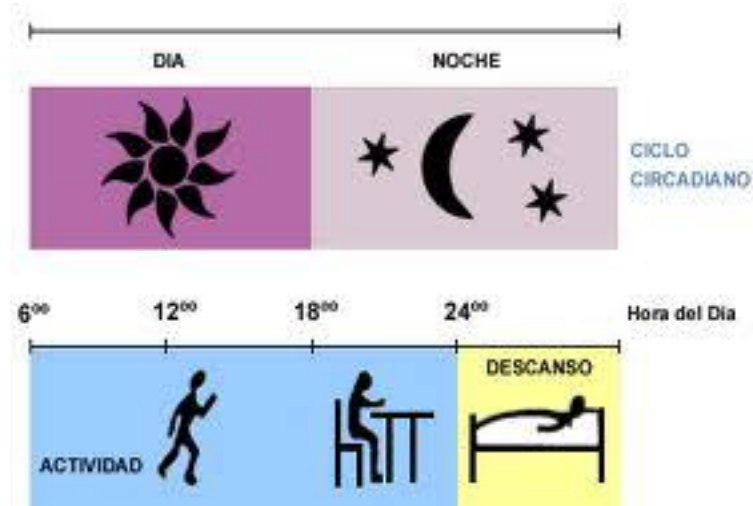


Fig 14: Ritmo circadiano no patológico.

Esta patología también se relaciona con la expresión de los genes reloj (Katzenberg y cols., 1998), pues los pacientes muestran una alteración de los ritmos circadianos (Sack y cols., 2007) que se manifiesta en problemas a la hora de dormir y despertar de manera sincronizada con el ambiente; algunos muestran insomnio, en cambio otros son capaces de dormir las horas necesarias si se guían por lo que les marca su propio reloj interno, aunque este sueño nunca es tan reparador, en cuanto a su calidad, como en pacientes sanos (Fig.15).

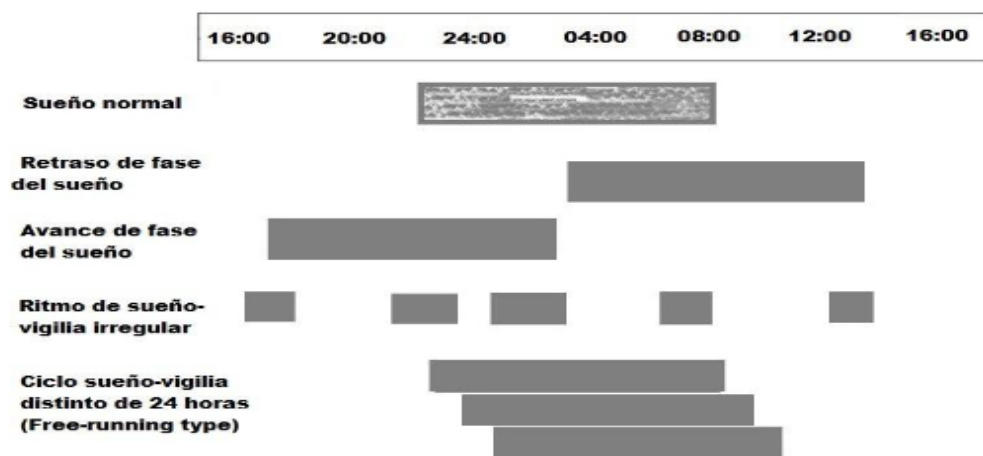
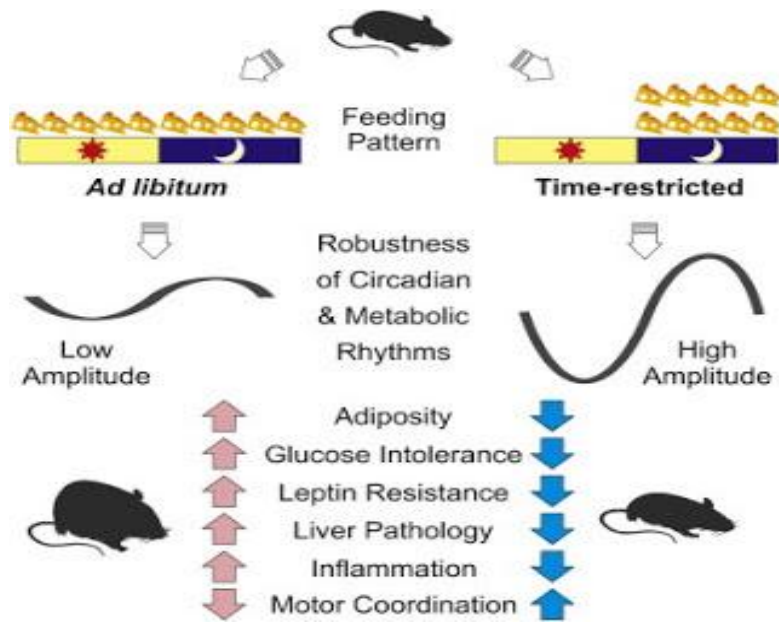


Fig 15: Trastornos del ritmo circadiano del sueño. La barra irregular representa el sueño normal. Las barras grises representan los períodos de sueño alterados. Silva, 2010.

Otra enfermedad, con alto grado de incidencia en nuestra sociedad, y que actualmente es una de las principales preocupaciones en sanidad, es la obesidad. Cada año, fallecen aproximadamente 2,8 millones de personas adultas como consecuencia del sobrepeso o la obesidad (OMS.Consultado en 2012). Por ello, esta patología preocupa mucho a nuestros médicos.

La obesidad también se relaciona con los ritmos circadianos (fig16). Hay estudios que demuestran que, incluso en periodo de inanición, la ritmicidad de los genes reloj persiste. El tejido adiposo secreta adipoquinas manteniendo una concentración rítmica en plasma, la cual muestra variaciones a lo largo de las 24 horas del día (Johnston, 2011).



*Fig 16:* Los animales que comen sin limitación de tiempo, muestran ritmos circadianos poco pronunciados, con escasa diferencia entre el día y la noche. El grupo con tiempo de ingesta restringido al horario nocturno, muestra ritmos circadianos más pronunciados. La amplitud de los ritmos circadianos estuvo asociada a genes que controlan el metabolismo y gestionan el consumo energético. Laborda, 2013.

La alteración de la expresión de los genes reloj también se reflejan en problemas de tipo renal (Fig-17), ya que estos genes se encargan de mantener la homeostasis interna de los niveles de agua y electrolitos ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ). El flujo renal (FRP), la tasa de filtración glomerular (TFG), la de reabsorción tubular y la de secreción, presentan fuertes oscilaciones circadianas (Firsov y cols., 2012).



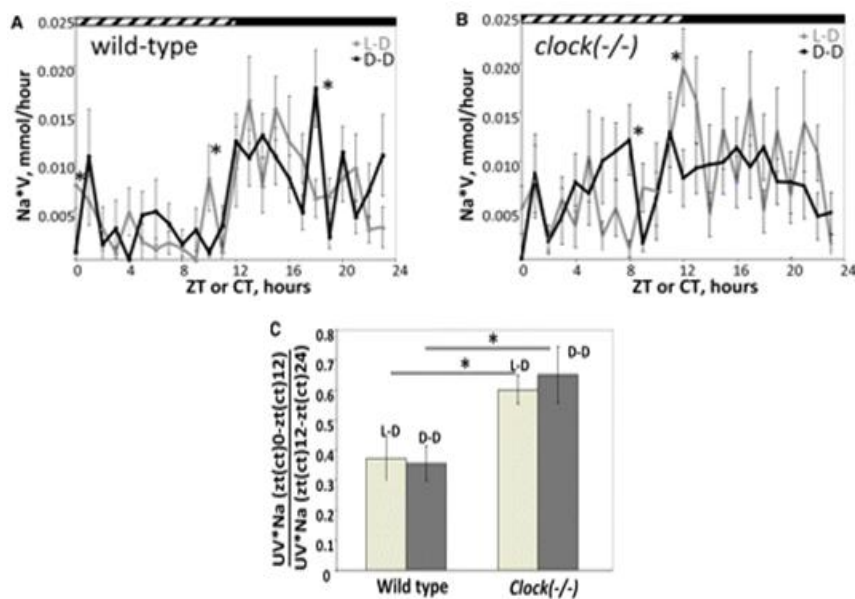


Fig 17: Ritmo circadiano y riñón: excreción urinaria de sodio. En ratas mutantes presenta un patrón alterado. Modificada de Firsov y cols.,2012.

El hígado, en condiciones normales, es capaz de autoregularse. Sus receptores nucleares se unen a ligandos, y funcionan de manera circadiana, Sin embargo, no es capaz de adaptarse rápidamente a cambios bruscos del reloj circadiano. *Per2* podría interactuar, transmitiendo la información del reloj circadiano a los receptores nucleares del hígado, para que actúen sobre los genes diana (Schmutz y cols., 2012). Deducimos que si este gen falla no habrá una correcta sincronización, y esto se manifiesta en una posible patología.

El sistema inmune también se encuentra íntimamente ligado con el sistema circadiano, ya que está bajo su control. La coordinación de la respuesta inmune con el ambiente es fundamental en los casos en que el organismo necesita una respuesta anticipada. Las interacciones entre los sistemas circadianos e inmunológicos son bidireccionales; los factores inmunológicos pueden modular la eliminación gradual de los relojes circadianos. Alteraciones circadianas, tales como la desincronización con el ambiente y/o funciones anómalas del reloj molecular, pueden conducir a la falta de coordinación del sistema, por lo que el organismo se vuelve más vulnerable ante las infecciones (Logan y Sarkar, 2012).

#### 4.1. Trastornos reproductivos.

Los ritmos circadianos influyen sobre un amplio rango de sistemas fisiológicos y rutas hormonales y neurales. La disrupción de la expresión de los genes reloj puede acarrear problemas reproductivos en los animales de experimentación (Miller y cols., 2004).

Para conocer el reflejo externo de las alteraciones circadianas, se han hecho estudios con ratones mutantes para los distintos genes implicados (Boden y Kennaway, 2006).

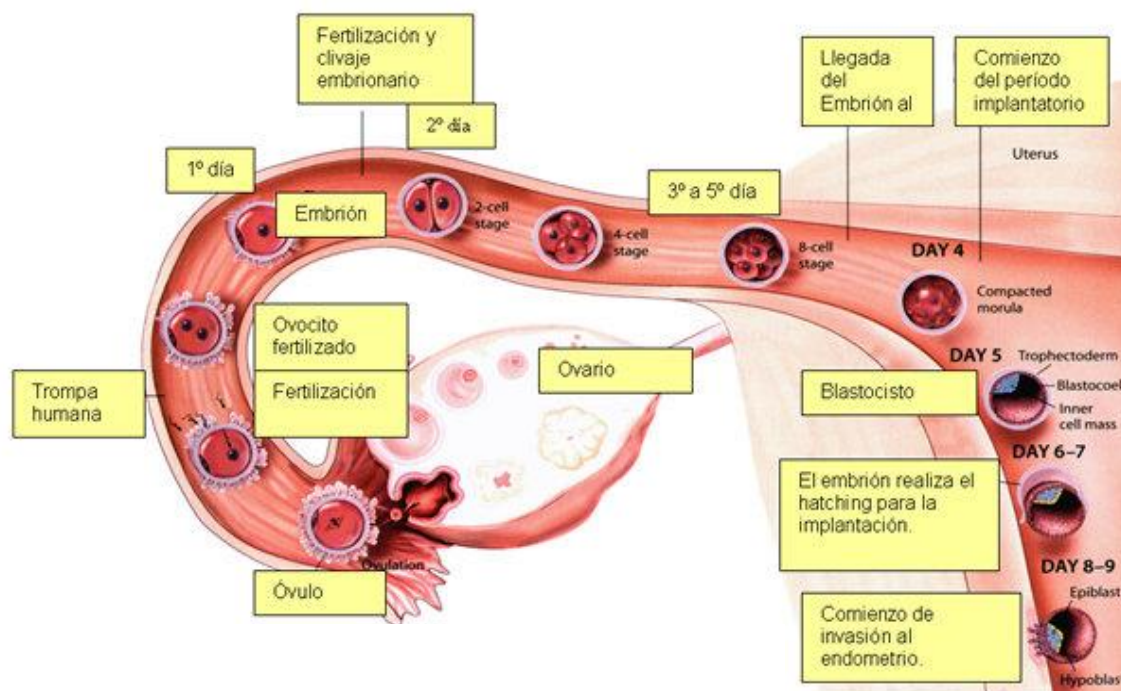
En general, los modelos knockout únicamente defectuosos para uno de los genes (*Per1*, *Per2*, *Per3*) o en combinación con *Cry1*, *Cry2*, *Cry1/Cry2* no presentan problemas mayores de fertilidad a lo largo de su vida. Sin embargo, evidencias sugieren que, los mutantes para *Clock* presentan defectos reproductivos, ya que las ratas homocigóticas son infértiles (Low-Zeddies y Takahashi, 2001.), y responden mal al tratamiento con gonadotrofinas (Herzog y cols., 2000), incluso se alarga su ciclo estral (Chappell y cols., 2003).

En cambio, si el que falla es el gen *Bmal1*, se presentan serias alteraciones en la función reproductiva: pubertad retrasada, ovarios y útero de menor tamaño, y embarazos no viables; por lo que debe ser considerado un gen crucial. Ratones Knockout para *Bmal1* pierden la ritmicidad en el NSQ y en los tejidos periféricos aún en ciclos normales de LO (Boden y Kennaway, 2004,2005; Boden y cols., 2006).

Hay estudios que relacionan los ritmos circadianos con la reproducción, el embarazo y el feto en roedores y primates, haciendo especial énfasis en el feto y los tiempos circadianos maternos. Incluso estudiaron la relación entre la dieta durante el embarazo y los problemas en el feto tras el parto y a largo plazo. Al vivir dentro de la madre, el feto está inevitablemente expuesto ritmos maternos internos como son la temperatura, los originados por la ingesta de alimento y por la melatonina materna, que atraviesa la placenta.

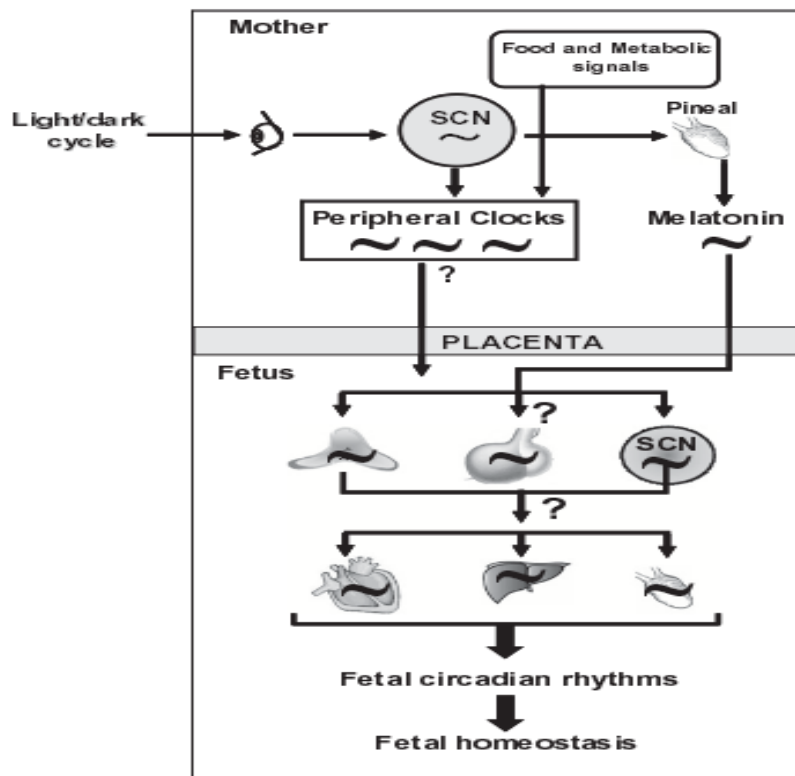
En ratones, antes de la implantación del embrión, este puede estar hasta 4 días libre en el oviducto (Fig.18). Se desconoce, hasta el momento, el impacto que tienen sobre él los ritmos circadianos, pero se ha comprobado que la expresión materna de los

genes reloj comienza en el estado de dos células y va decreciendo hasta que tiene lugar el proceso de compactación (Johnson y cols., 2002; Hamatani, 2004), por lo que es probable que el embrión durante su desarrollo este expuesto a los ritmos maternos mientras este atraviesa el oviducto. En ratas ya se ha demostrado que el oviducto expresa tanto los genes reloj como genes dependientes de estos con una ritmicidad periódica de 24 horas (Kennaway y cols., 2003).



*Fig18:* Fases de fecundación e implantación en humanos. El embrión atraviesa el oviducto, y al hacerlo se expone a los ritmos maternos.

Esta información sugiere que el ritmo circadiano fetal es distinto al del ser adulto. Es más, el ritmo circadiano fetal no sólo está presente mientras el feto es inmaduro, sino que tiene importancia en la vida postnatal. Diversos autores proponen que el NSQ fetal y los órganos fetales funcionan como osciladores periféricos maternos (Fig.19). Gracias a esta interacción materno-fetal se produce una sincronización dentro de la placenta y tras el nacimiento el feto es capaz de acoplarse a un ritmo circadiano “adulto” dirigido por el NSQ y por el ciclo LO (Seron-Ferre y cols., 2012).



*Fig.19:* Sistema circadiano fetal y su interacción con el ritmo circadiano materno. La glándula suprarrenal fetal, a través de la producción de glucocorticoides, sirve como nexo entre ambos ritmos. Serón-Ferré y cols., 2012

Durante el embarazo, el tipo de dieta ingerida, el estrés materno, y otros factores, pueden alterar los relojes fetales desencadenando variaciones metabólicas que se manifiestan tras el parto.

Estudios en rata muestran evidencias indirectas de que las variaciones circadianas influyen en el desarrollo de la preñez, ya que si se suprime el ciclo LO se reduce el crecimiento del feto. Sin duda, el efecto más severo fue observado bajo condiciones de luz constante, ya que el peso del feto a término se reducía hasta un 24% (Gozeri y cols., 2008; Waddell y cols., 2012). En este sentido, se ha comprobado que las trabajadoras de líneas aéreas presentan mayor riesgo de aborto espontáneo, ciclos menstruales irregulares, sus bebés al nacer pesan menos, y también se incrementa la incidencia de nacimientos prematuros (Bisanti y cols., 1996).

Todo esto evidencia que las variaciones en el ritmo circadiano se reflejan afectando negativamente a las adaptaciones maternas al embarazo, y alterando el ambiente óptimo fetal.

La histología de la placenta se muestra anormal en los sujetos sometidos a ritmos luz-oscuridad alterados, presentando mayor porcentaje de edema, acumulaciones de fibrina e infiltraciones de leucocitos (Gozeri, 2008).

En ratas, se ha visto que esto puede desencadenar abortos o problemas en el desarrollo postparto, como en el caso de la intolerancia a la glucosa o de la resistencia a la insulina, aunque el peso al nacer sea normal (Bellavía y cols., 2006; Varcoe y cols., 2011). Estos efectos pueden, en parte, estar mediados por alteraciones en la melatonina, ya que la pinealectomía durante la gestación desincroniza el ritmo de ingesta de agua en el feto, pero la administración de una dosis diaria adecuada de melatonina lo reemplaza (Bellavia y cols., 2006).

En humanos, también hay evidencias indirectas de problemas en el desarrollo, abortos y embarazos pretérmino (Mahoney y cols., 2010), pero hasta el momento, no hay ningún artículo que relacione mutaciones concretas de los genes reloj con sus consecuencias directas en la función reproductiva.

## **5. GENES RELOJ Y PLACENTA.**

Se estudió la expresión de los genes reloj en placenta de ratas preñadas, y se corroboró que los nueve tipos de genes reloj se expresan, que lo hacen de manera circadiana y que su expresión difiere en sus dos regiones placentáreas: la materna y la fetal; pues aunque ambas zonas derivan del trofoblasto, tienen funciones claramente distintas, y rutas diferentes en cuanto a la expresión de los genes se refiere (Wharfe y cols., 2011).

En la zona donde se produce el intercambio materno-fetal, que crece rápidamente en el tercer periodo de la gestación, se expresan más los genes *Clock*, *Per1* y *Cry2*. En cambio, en la otra zona, el lugar con mayor producción hormonal, y que no crece tanto en el tercer periodo, la expresión de los genes *Bmal1*, *Per2*, *Per3* y *Cry1* es mayor.

Aunque se observa cierta variación circadiana según la zona a estudiar, esta es más evidente si se tiene en cuenta el conjunto global de placenta.

Independientemente de la zona de la placenta en que nos encontremos, hay efectos muy marcados en relación con los genes *Bmal1* (Ratajczak y cols., 2010), *Per1* y *Per2*.

Este estudio también ha confirmado que la expresión y variación de los genes reloj se altera en el hígado de la rata preñada, posiblemente para contribuir a las adaptaciones fisiológicas maternas, y que durante el embarazo los niveles absolutos de corticosteron (hormona esteroide de tipo corticoide), medidos en plasma, se elevan.

Frigato y cols. demostraron in vitro, en el año 2009, la expresión rítmica de los genes reloj en las células del trofoblasto de la zona *extravillous*. Pero, hasta el momento, no hay estudios in vivo referidos a la placenta humana, tema que nos ocupa.

El reciente descubrimiento de que los genes reloj se expresan en la placenta, sumado a observaciones que demuestran que si el ritmo circadiano se altera, compromete el buen funcionamiento de la placenta, sugiere que las variaciones circadianas pueden ser un componente importante del fenotipo placentario normal.

Ha quedado demostrado que la placenta es un órgano rítmico. Además, es sabido, que la mayoría de los ritmos circadianos maternos se mantienen a lo largo de todo el embarazo, y los ritmos fetales se desarrollan en el útero de especies precociales (aquellas en las que las crías son capaces de ver, oír, ponerse en pie y demás funciones propias del individuo adulto desde prácticamente al nacer), incluidos los humanos. Por ello, sería sorprendente si estas influencias no conllevasen algún tipo de ritmicidad placentaria. Lo que está menos claro es, si la placenta, como oscilador endógeno, conlleva a una función rítmica placentaria.

Los ritmos circadianos, también se relacionan con el momento del parto. Aunque esta es una relación controvertida, pues hay datos estadísticos enfrentados en humanos. La melatonina y la oxitocina interaccionan de manera especie-específica facilitando el parto en el momento apropiado del día (Olcese, 2012).



*Fig 24: Recién nacido*

Se necesitan nuevos estudios para dilucidar la función de los genes reloj de la placenta durante la gestación. También es importante compararlos entre varias especies, particularmente en aquellas en las que el desarrollo circadiano sucede en el útero, ya que esto supondrá avances en el conocimiento de la fisiología y patología placentaria.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## **1. JUSTIFICACIÓN**

Numerosos estudios han demostrado que los genes reloj se expresan, y que en muchos casos lo hacen de manera circadiana, en diversos órganos y tejidos del cuerpo (hígado, pulmones, etc.). Incluso en tejidos relacionados con el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, como sucede en el caso del útero, el oviducto, los ovarios y los ovocitos.

En placenta de ratas, se ha confirmado la existencia de este tipo de genes, sin embargo, no hay estudios publicados sobre su presencia en placenta humana.

Como ya ha sido mencionado, la expresión rítmica de los genes reloj regula tanto procesos fisiológicos como determinados aspectos del comportamiento, motivo por el cual, hoy en día, el origen de determinadas patologías se relaciona con la desincronización en la expresión de estos genes.

Respecto a la capacidad reproductiva, en ratas, se ha visto que variaciones en la expresión de genes reloj pueden desencadenar abortos o problemas en el desarrollo postparto. En humanos hay evidencias indirectas, pero no hay ningún artículo que relacione alteraciones en la expresión génica con sus consecuencias reproductivas. Se necesita investigar más para descubrir la implicación de los genes reloj a lo largo de la gestación.

## **2. HIPOTESIS**

Los genes reloj, *Clock*, *Cry1* y *Per2* se expresan en tejido placentario humano. La expresión de dichos genes sigue un patrón rítmico.

## **3. OBJETIVOS**

- El objetivo principal de este proyecto es demostrar si la placenta humana a término expresa o no determinados genes reloj (*Clock*, *Cry1* y *Per2*).
- En el caso de que se expresen, analizaremos si siguen un patrón circadiano rítmico.



# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. SUJETOS DE ESTUDIO

Para realizar el presente trabajo, se estudiaron 16 mujeres gestantes a término de raza blanca, sanas y con una edad media de 32.5 años, comprendida entre los 23 y los 40 años.

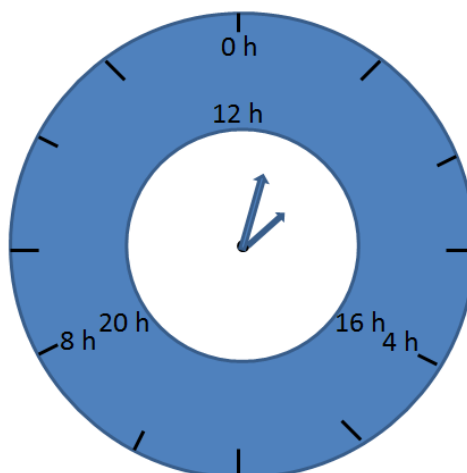
En el momento del parto la ginecóloga informó a cada una de las gestantes y firmaron el correspondiente consentimiento.

Los partos tuvieron lugar en la unidad de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA).

## 2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Tras el parto y expulsión de la placenta, se obtiene una muestra de la misma. La selección del fragmento fue de forma aleatoria, mediante sección transversal de todo su espesor. El peso medio de cada fragmento es de 23.09 gramos.

Las muestras fueron recogidas en seis tiempos circadianos (TC) diferentes: 00:00, 04:00, 08:00, 12:00, 16:00 y 20:00 horas (Fig.21)



*Fig.21 : Tiempos Circadianos*

El número de muestras estudiadas para cada TC fue de:

- ❖ 00:00 horas.....3 muestras.
- ❖ 04:00 horas.....1 muestra.
- ❖ 08:00 horas.....3 muestras.
- ❖ 12:00 horas.....2 muestras.
- ❖ 16:00 horas.....2 muestras.
- ❖ 20:00 horas.....5 muestras.

\*En el caso del gen *Cry*, no hay ninguna muestra válida para el TC 12:00 h.

Inmediatamente se congelan por separado y almacenan a -80°C hasta su posterior uso.

### **3. BIOLOGÍA MOLECULAR**

#### **3.1 Extracción de ARN (ácido ribonucleico)**

Tras la homogenización mecánica utilizando el homogenizador “Politron PT3000” (Kinematica AG; Luzern, Suiza) de un fragmento de aproximadamente 80 mg de tejido placentario con 1 ml del reactivo Easy-Blue, se aisló el ARN utilizando el kit comercial “Easy Blue Total RNA extraction Kit” (iNtRON Biotechnology, Inc.; Korea) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para evitar posibles contaminaciones durante este procedimiento se utilizó material estéril (autoclavado) y guantes estériles.

El procedimiento seguido se detalla a continuación:

- Añadir 200 µl de Cloroformo. Agitar en el vortex a temperatura ambiente durante 10 segundos.
- Centrifugar: 10 minutos. 13.000 rpm en una microcentrífuga refrigerada (4°C). Recoger 400 µl de sobrenadante.
- Añadir 400 µl de isopropanol(2-propanol). Invertir. Dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.

- Centrifugar: 5 minutos. 13.000 rpm. 4°C. Decantar para eliminar el sobrenadante.
- Añadir 1 ml de etanol al 70%. Invertir las fases.
- Centrifugar: 5 minutos. 10.000 rpm. 4°C. Decantar. Dejamos reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 35 µl de agua miliQ estéril. Homogenizar.
- Almacenar la muestra a -70°C.

### **3.2 Calidad de la muestra.**

La calidad del ARN obtenido se verificó usando un medidor de absorbancia (espectofotómetro) llamado “Nanodrop Epoch” (BioTek, Estados Unidos). Todas las muestras utilizadas mostraron una razón de absorbancia 260/280 nm entre 1.8 y 2; valor considerado adecuado para garantizar la calidad de la muestra.

### **3.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc). Transcripción inversa (RT).**

Antes de que se pueda realizar una medida de la expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real, el ARNm (mensajero del ácido ribonucleico) de la muestra debe ser copiado a ADN complementario (ADNc) por transcripción inversa (RT).

Cada muestra de ARN fue transcrita a ADNc utilizando el kit para RT-PCR, “iScript cDNA Synthesis Kit” (Bio-Rad, Estados Unidos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Preparar una mezcla que contenga, por muestra:

- 4 µl de Buffer.5x *iScript reaction mix*.
- 14 µl Agua libre de nucleasas (*Nuclease-free Water*).

Preparar cada muestra, como sigue:

- 18 µl de la mezcla.
- 1 µl de la muestra problema, que contiene RNA.

Volumen final: 19 µl TOTALES

Encendemos el Termociclador “icycler” (Bio-Rad, Estados Unidos), y lo programamos. Se colocan las muestras y al cabo de 45 minutos hemos obtenido ADNc.

### **3.4 Calidad del ADNc**

Medimos cada muestra usando el programa “Nanodrop 2000” (Thermo Scientific, Estados Unidos) eligiendo la opción de ácidos nucleicos.

Usamos como blanco 2 µl del agua libre de nucleasas.

Para realizar la medida se pipetea 2 µl de las muestras de DNAc, limpiando el lector entre muestra y muestra.

Limpiar con agua Braun estéril inyectable (Melsungen, Alemania).

Como resultado obtenemos medidas de la concentración y de la calidad de la muestra. Para que una muestra sea de calidad, la relación entre la Absorbancia a 260 nm (Ab de los ácidos nucleicos) y 280 nm (Ab de las proteínas) debe estar comprendida entre 1.8 y 2.

### **3.5 Protocolos de PCR a tiempo real.**

Para el estudio de la expresión génica y para detectar la abundancia de ARNm en las muestras estudiadas, se utilizó Sybr Green como fluorocromo. Concretamente, el reactivo (mastermix) empleado fue el “Syber Green PCR Supermix 2x” (Bio-Rad; Estados Unidos). El agua estéril de B.Braun Medical (Melsungen Alemania). El material fungible, tiras de tubos de 0.2 ml y tapas planas (Axygen Scientific Inc, CA, Estados Unidos).

Todas las muestras se estudiaron por duplicado. Para aceptar los resultados, la diferencia entre los Ct (ciclo en el que se detecta un aumento significativo de la fluorescencia en la PCR) de ambas réplicas no puede ser superior a 0.5.

#### **3.5.1. Detección de la expresión génica.**

Para la identificación del control endógeno en el estudio de la expresión génica en placentas obtenidas tras el parto se utilizaron cebadores para algunos de los genes reloj (*Clock*, *Cry1*, *Per2*) y un gen control (*HPRT1*). La secuencia de los cebadores y otros datos de interés se muestran en la tabla 5.

Nombre Primer	Secuencia (5' to 3')	Peso Molecular	T melting	T hibridacion	Nº GenBank
HPRT1-D	GGA TAT AAG CCA GAC TTT GTT GG	7119,6	76,5 °C	55,7 °C	M0505C10
HPRT1-R	CAA ACA TGA TTC AAA TCC CTG A	6672,4	76,5 °C	55,7 °C	M0505C11
CLOCK-D	CAA GGA AAT GTG CAC TGT TGA	6495,2	78 °C	55,7 °C	M0505C12
CLOCK-R	TAT TAT GGG TGG TGC CCT GT	6171	78 °C	55,7 °C	M0505D01
CRY1-D	CAG GCT TTT CAA GGA ATG GA	6182	79,50 °C	55,7 °C	M0505D02
CRY1-R	ACC ATT GAG TTC TAT GAT CTT GTC T	7614	79,50 °C	55,7 °C	M0505D03
PER2-D	GTG TCA GTG TCC GGA AAA GC	6183	85,50 °C	55,7 °C	M0505D04
PER2-R	GGG GCT TCA TAA CCA GAG TG	6183	85,50 °C	55,7 °C	M0505D05

*Tabla 5:* La tabla representa la secuencia de los cebadores utilizados, su peso molecular, la temperatura de *Melting* y la temperatura de hibridación.

**Volumen final de PCR:** Para los genes endógenos la mezcla utilizada en la reacción estaba formada por 2 µl de ADNc en un volumen final de 20 µl según indicaban las instrucciones del fabricante.

- H<sub>2</sub>O estéril.....7.2 µl
- Mezcla de Cebadores.....1µl
- *Sybr Green* (2x).....10µl
- ADNc.....2µl

**Protocolo de amplificación:** El protocolo de PCR a tiempo real (Fig.22) consistió en:

- Etapa inicial a 95°C durante 5 minutos.
- 45 ciclos de amplificación:
  - 15 segundos a 94°C para desnaturalizar el cDNA,
  - 30 segundos a 60°C para hibridar,
  - 1 minuto a 55,7°C para elongar,

Los datos de fluorescencia se recogieron a 55,7°C.

**Protocolo de *melting*:** El análisis de la curva de *melting* para confirmar la especificidad del producto celular fue llevada a cabo inmediatamente después de la amplificación:

- Desnaturalización durante 1 minuto a 95°C.
- Hibridación 1 minuto a 65°C.
- Incrementos de 0.5°C (30 segundos cada uno) durante 60 ciclos comenzando a 65°C y monitorizando la fluorescencia emitida por la muestra.

**Termociclador:** Se utilizo el “CFX96 Real time System” (Bio-Rad, Estados Unidos).

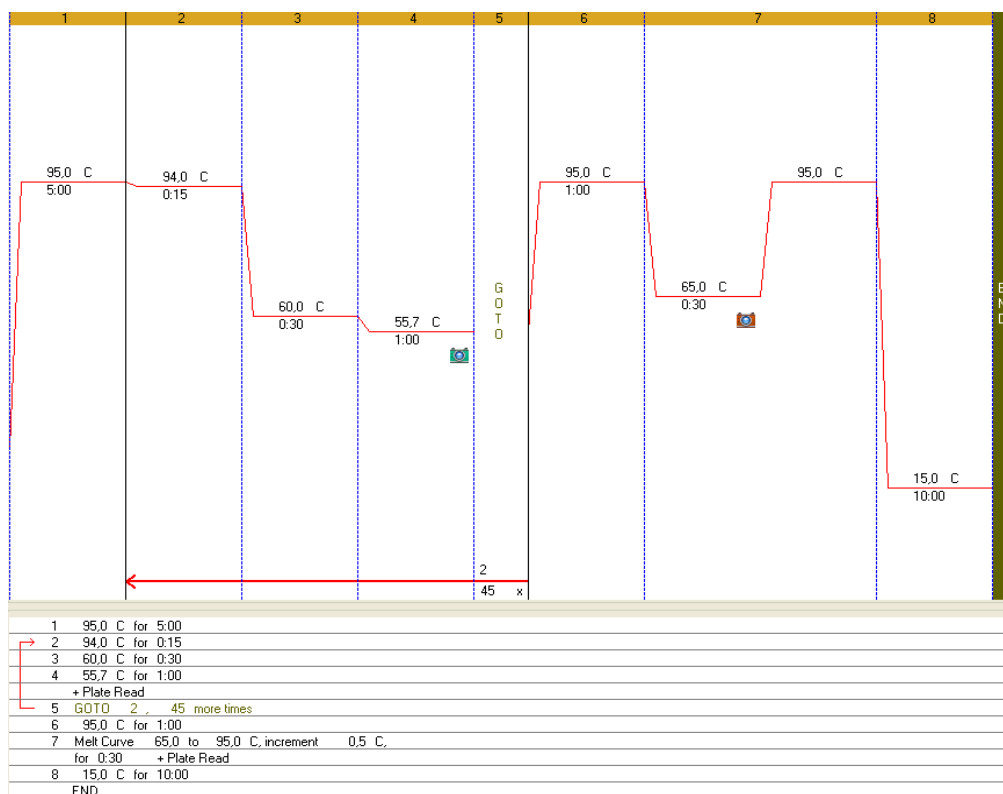


Fig 22: Protocolo PCR.

### 3.5.2. Eficiencias, Coeficiencias y T<sup>a</sup>s de Melting.

Las eficiencias de las reacciones de PCR se calcularon a partir de una curva estándar elaborada con una mezcla de las muestras de placenta con ocho puntos; oscilando entre 55 y 65 grados.

Las temperaturas de *melting* alcanzadas (Fig. 23, 24, 25) fueron próximas o superiores a 80°C, quedando, por tanto, descartada la formación de dímeros.

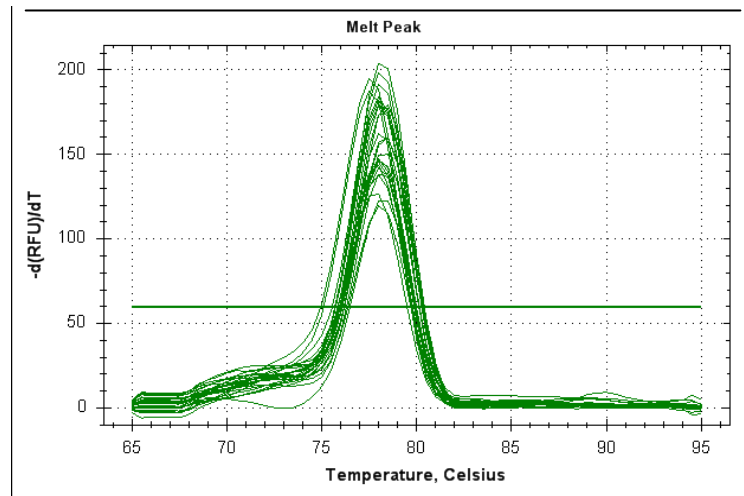


Fig.23: PCR: Tmelting del gen *Clock*.

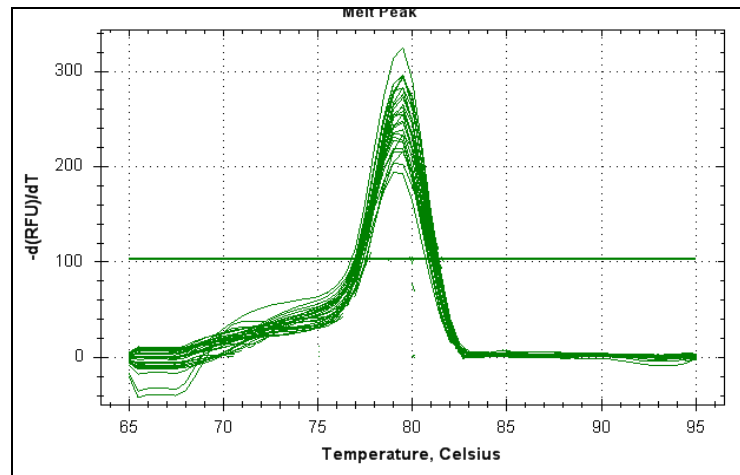


Fig 24: PCR: Tmelting del gen

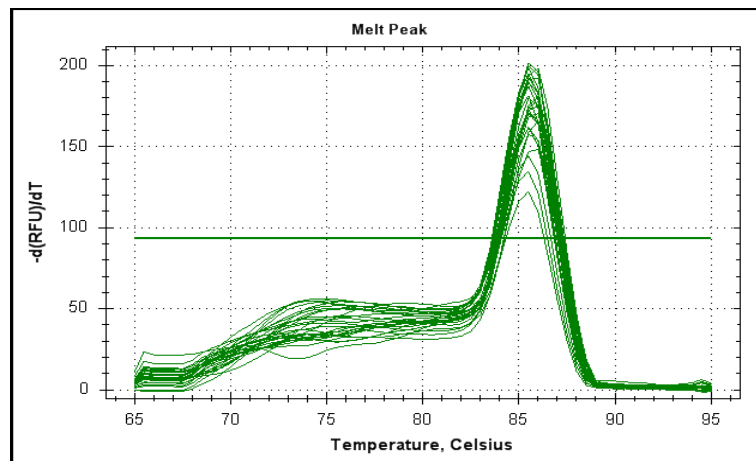


Fig.25: PCR: Tmelting del gen *Per2*.

### 3.5.3. Normalización.

Los resultados se normalizaron usando el gen de referencia HPRT1, cuya secuencia se muestra en la tabla 5.

### 3.5.4. Cálculo de la expresión génica.

El nivel de expresión para cada uno de los tres genes se obtuvo a través del cálculo del parámetro delta Ct, como sigue:

- I.  $\Delta Ct: \bar{X} Ct (\text{gen problema muestra } x) - \bar{X} Ct (\text{gen de referencia}).$
- II.  $\Delta\Delta Ct: \bar{X} \Delta Ct (\text{gen problema}) - \bar{X} \Delta Ct (\text{grupo control}).$
- III.  $2^{-\Delta\Delta Ct}.$



# RESULTADOS

## 1. Resultados generales.

Los resultados de este trabajo muestran que los tres genes reloj estudiados (*Clock*, *Cry1* y *Per2*) se expresan en la placenta humana a término.

La prueba de esa expresión se observa en las figuras 26, 27 y 28, las cuales representan el momento en el que los genes reloj *Clock*, *Cry* y *Per* respectivamente comienzan a amplificar (Ct).

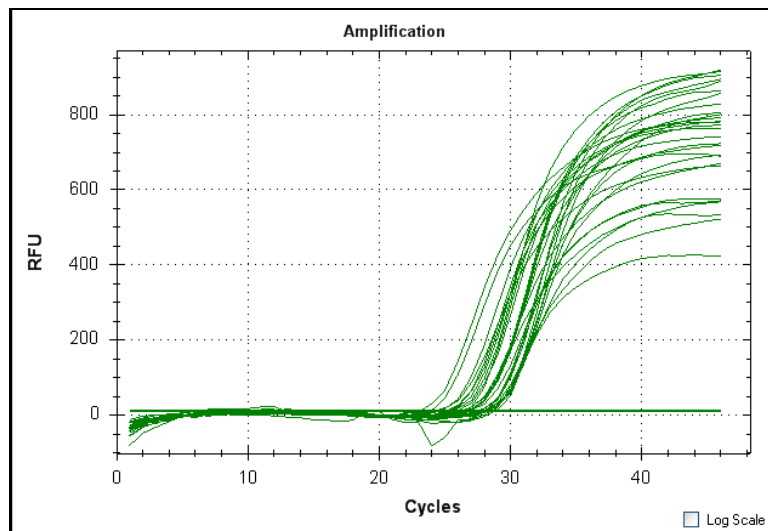


Fig.26: PCR: amplificación del gen *Clock*.

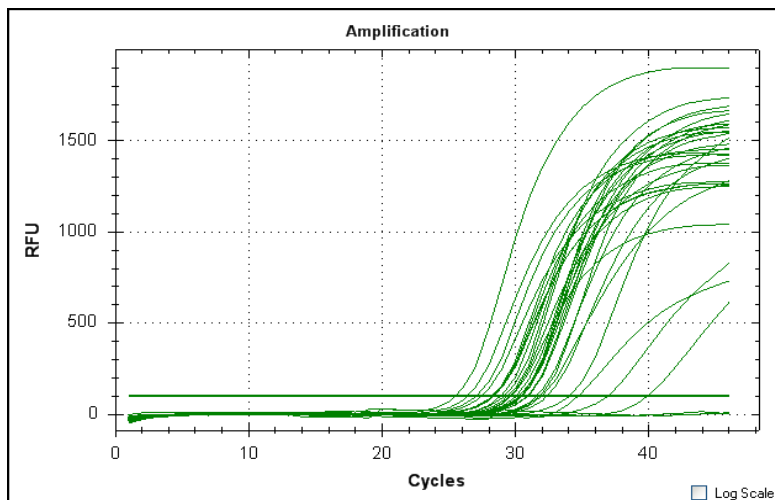


Fig.27: PCR: amplificación del gen *Cry1*.

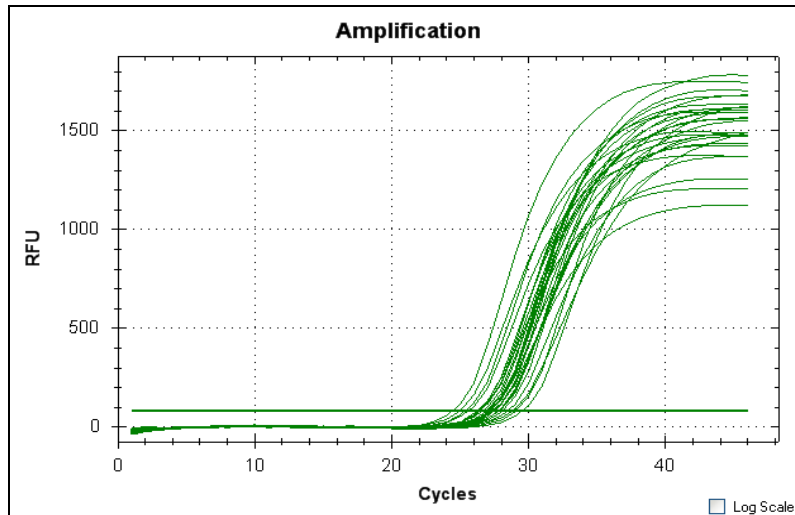


Fig28: PCR: amplificación del gen *Per2*.

## 2. Resultados específicos de cada gen.

### 2.1. Gen *Clock*.

La expresión del gen *Clock* es elevada a las 00:00 h, disminuye progresivamente hasta alcanzar un valor mínimo a las 08:00 h, asciende de nuevo lentamente llegando a las 16:00 h a su nivel de máxima expresión, para volver a disminuir a las 20:00 h. Los picos de máxima expresión tienen lugar, por tanto, a las 00:00 y a las 16:00 horas, mientras que los de mínima expresión se dan a las 08:00 y a las 20:00 horas (Fig29).

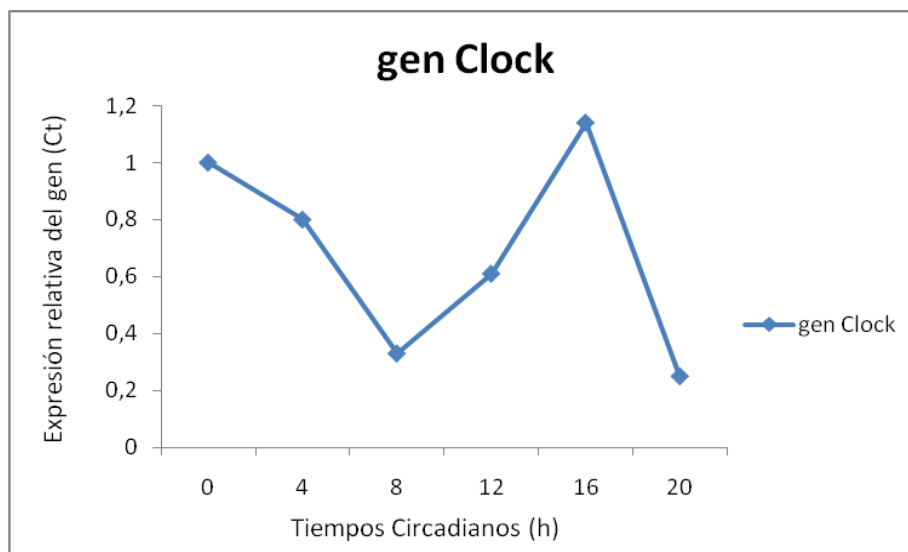
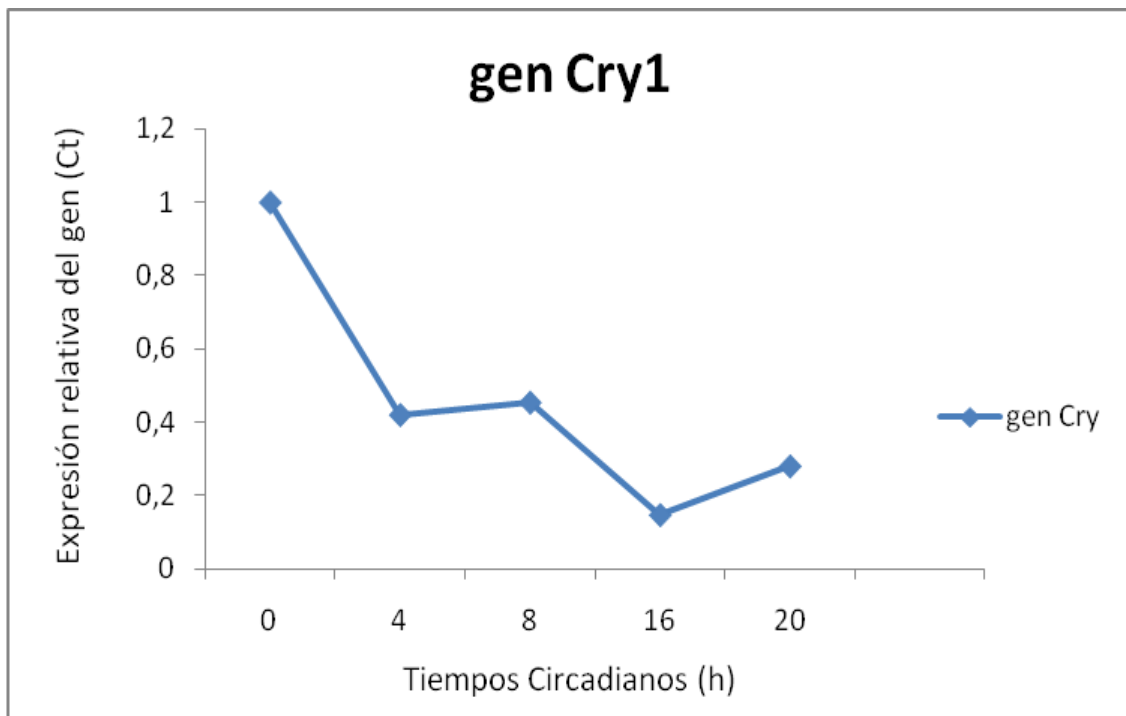


Fig.29: Nivel de expresión relativa del gen reloj *Clock* en los diferentes TC

## 2.2. Gen *Cry1*.

El gen *Cry1*, muestra una expresión máxima a las 00:00 h. Posteriormente, la expresión se mantiene constante y comienza a descender a lo largo de la mañana, alcanzando los valores más bajos a las 04:00 de la tarde. El pico máximo, como se ha dicho, tiene lugar a las 00:00 h, momento a partir del cual la expresión varía sin llegar a mostrar valores extremos, que reflejen picos marcados (*Fig30*).

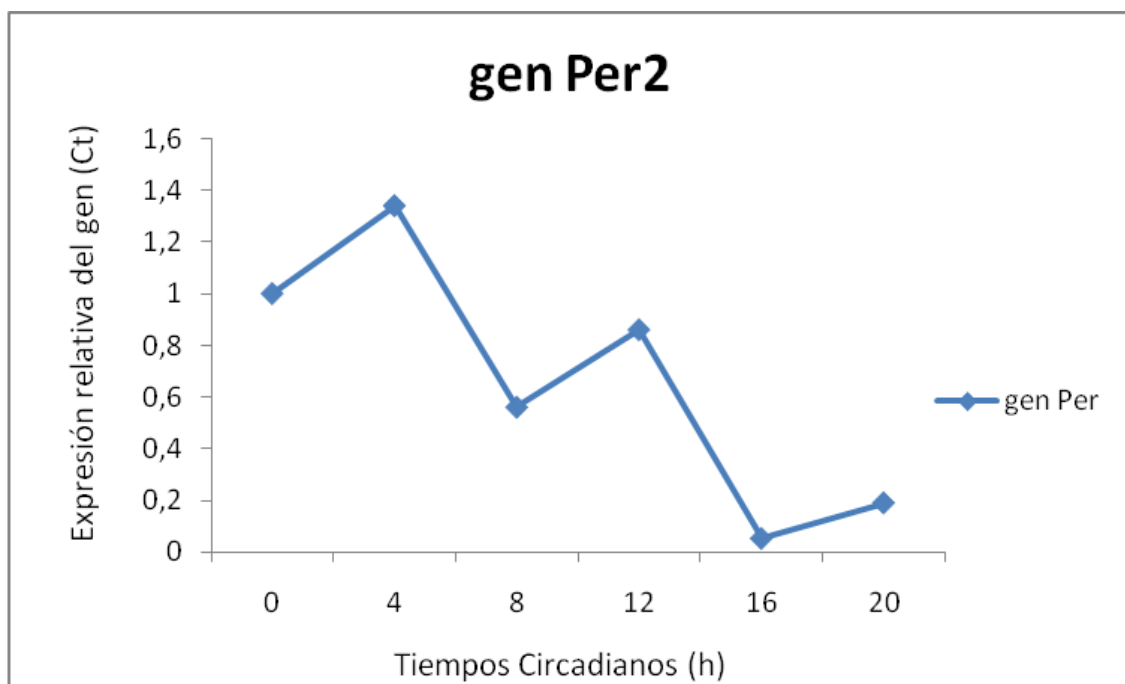
En este caso, como se observa en la figura, no se representa el TC correspondiente a las 12:00 h, por haber sido descartada la muestra para este gen al no cumplir nuestros requisitos.



*Fig. 30:* Nivel de expresión relativa del gen reloj *Cry1* en los diferentes TC.

### 2.3. Gen *Per2*.

La expresión del gen *Per2*, al comienzo del día, es elevada pero no máxima; aumenta hacia las 04:00 h y disminuye a las 08:00 h para volver a ascender hasta un valor de expresión medio que coincide con las 12:00 h. Desde esta hora, sus niveles descienden, presentando un valor mínimo a las 16:00 h, que remonta ligeramente a las 20:00h. El pico máximo, por tanto, tiene lugar a las 04:00 h, el valor medio a las 12:00 y el pico mínimo a las 16:00h (*Fig31*).



*Fig.31:* Nivel de expresión relativa del gen reloj *Per2* en los diferentes TC.

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran, por primera vez, que los genes reloj *Clock*, *Cry2* y *Per1* se expresan en placenta humana a término.

Existen estudios previos, en los que se observa una expresión rítmica de algunos genes reloj, como es el caso de *Per2* y *Bmal*. Si bien estos trabajos se llevaron a cabo en cultivos celulares obtenidos a partir de una línea celular de trofoblasto humano, hay que destacar que dichos genes solo se expresan tras la estimulación celular por hipoxia (Frigato y cols., 2009). Este método ha sido utilizado previamente por otros autores para inducir una expresión rítmica de genes reloj en cultivos de diferentes líneas celulares (Balsalobre y cols., 1998).

Igualmente, se ha demostrado la expresión de genes reloj en tejido placentario de ratas. Dichos estudios permitieron que la placenta fuese considerada un órgano rítmico (Wharfe y cols., 2011; Waddel y cols., 2012).

La expresión de los genes reloj en órganos y tejidos humanos como el hígado, el pulmón, el páncreas, etc, incluyendo aquellos relacionados con la reproducción, como el útero, el oviducto, el ovario y los ovocitos, sigue un patrón rítmico circadiano (Escobar y cols., 2006; Kennaway y cols., 2012b). Por tanto, cabe pensar que la placenta humana sigue la misma pauta de expresión.

El presente estudio tiene ciertas limitaciones, como su reducido tamaño muestral. No obstante, los datos nos permiten observar una tendencia hacia un patrón rítmico en los tres genes estudiados. El comportamiento entre estos tres genes difiere, ya que aunque todos parten de una elevada expresión a las 00:00 h que disminuye posteriormente a las 04:00 h, el gen *Per2*, en concreto, aumenta su valor a partir de esa hora, mostrando un pico máximo a las 04:00 horas.

Los resultados del gen *Per2*, se asemejan a los del gen *Cry1*. Una posible explicación para tal observación podría ser, que las proteínas codificadas por estos dos genes, funcionan de manera conjunta, ya que se asocian a mitad del día circadiano

formando un heterodímero para emitir una señal negativa, que inactiva la transcripción de estos genes (Hastings y cols., 2007).

Si bien el comportamiento de *Per2* y *Cry1* a lo largo del día circadiano es similar, parece que la expresión del gen *Per2* no disminuye de manera constante a partir de las 00:00h, sino que presenta oscilaciones intermedias. Consideramos por tanto que la influencia de la hora del día es más clara sobre el gen *Cry1*. En este sentido, se ha detectado ritmo circadiano tanto en el caso del gen *Cry1* como en el del *Cry2* en placenta de ratas, aunque sus ritmos son de baja amplitud, especialmente si se comparan con los ritmos mostrados en el hígado de los mismos roedores (Ratajczak y cols., 2010).

Los genes *Cry1* y *Per2* presentan un comportamiento muy diferente al del gen *Clock*. El gen *Clock* muestra un valor pico durante el día, a las 16:00 h. En cambio, para ese mismo TC los genes *Cry1* y *Per2* expresan su valor mínimo.

Estos resultados concuerdan con el conocimiento previo de que algunos genes reloj se encuentran en antifase respecto a otros genes reloj (Reppert y Weaver, 2002). En el estudio llevado a cabo por Wharfe y cols., (2011), los autores encontraron un patrón inverso para *Bmal1* y los genes tipo *Per*. Al igual que sucede con los genes *Per* y *Cry*, *Bmal1* y *Clock* también se asocian, esta vez al inicio del día circadiano, formando un heterodímero que se une a secuencias reguladoras para activar la transcripción de dichos genes (Hastings y cols., 2007).

Como ya ha sido mencionado, no existen estudios previos en placenta humana, similares al que aquí se presenta. A diferencia de nuestro trabajo en humanos, los autores que analizaron tejido placentario en ratas, separaron la placenta en dos zonas: Laberinto (*Labyrinth*: lugar donde se produce el intercambio materno-fetal) y zona de unión (*Junctional*: región donde se sintetizan las hormonas), y las analizaron por separado. Sus estudios muestran que la expresión de cada gen reloj (*Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* y *Cry2*) es distinta en cada una de las dos zonas; aún así, su patrón circadiano no es tan marcado como sucede en otros tejidos.

Estos autores afirman que la expresión génica varía entre las dos zonas, siendo muy elevada para los genes *Clock*, *Per1* y *Cry2* en la zona del laberinto. La expresión elevada de los genes *Bmal1*, *Per2*, *Per3* y *Cry1*, en cambio, se da en la zona de unión. La importancia fisiológica de estas diferencias no está clara, pero revela que ambas zonas son funcionalmente distintas.

La amplitud de los ritmos de estos genes reloj es relativamente baja, aunque se observan efectos marcados al principio y al final del día circadiano en el caso de los genes *Bmal1*, *Per1* y *Per2*. Su expresión, además, parece ser paralela, mostrando un pico de valor máximo en la fase oscura. En concreto, la expresión de *Bmal1*, y la de *Per3* en la zona del laberinto se mantiene prácticamente constante a lo largo del día, elevándose ligeramente en el TC 13:00 horas.

Ambos autores coinciden en que la expresión de los genes *Bmal1*, *Per1* y *Per2* sucede de manera paralela, mostrando picos en la fase de actividad, la nocturna. (Waddell y cols., 2012; Wharfe y cols., 2011).

En muchos aspectos no podemos comparar los resultados de nuestro trabajo con los de autores previos por varios motivos: Su diseño experimental se basa en roedores, mientras nuestro objeto de estudio son los humanos. Además, Wharfe y cols., 2011 y Waddell y cols., 2012, dividen la placenta en dos zonas para analizarlas por separado, mientras que en nuestro caso la estudiamos como una unidad.

A pesar de estas diferencias metodológicas, la expresión del gen *Per2* en la zona de unión obtenida por Wharfe y cols., 2011, es similar a la que muestra en el presente trabajo. Nuestros TC 00:00, 08:00 y 12:00 coinciden con sus TC: 01:00, 07:00 y 13:00; son valores medio-altos, que descienden un poco a lo largo del día para ascender de nuevo. Según nuestros resultados, en el TC correspondiente a las 20:00 h, la expresión génica es muy baja. En cambio, en los resultados de Wharfe y cols, a las 19:00 horas presentan un pico de máxima expresión.

La expresión obtenida de los genes reloj parece mostrar un ritmo de mayor amplitud que la de otros autores. Debido a las limitaciones que presenta nuestro estudio (no nos permite aplicar un análisis estadístico), consideramos que son necesarias, nuevas investigaciones.

A pesar de la clara evidencia de que los genes *Clock*, *Per1* y *Cry2* se expresan en la placenta humana, no sabemos cual puede ser la influencia de dichos genes en la función placentaria.

En diversos órganos, la alteración de la expresión de los genes reloj desencadena patologías concretas, como el insomnio (Morris y cols., 2012), la obesidad (Johnston y cols., 2011), problemas de tipo renal (Firsov y cols., 2012), hepáticos (Schmutz y cols., 2012) e inmunológicos (Logan y Sarkar, 2012). Esto hace pensar que en la placenta podría suceder lo mismo, por ejemplo en el caso de la diabetes gestacional o de la preeclampsia. Sin embargo, no hay estudios *in vivo* que no empleen ratones knockout, que relacionen la disrupción en la expresión de los genes reloj con el crecimiento fetal o el peso del feto al nacer.

A la vista de los resultados de este trabajo, queda claro que es necesario continuar con este estudio, para establecer con claridad el comportamiento rítmico, y, posteriormente, sería interesante dilucidar cual es el papel del reloj circadiano placentario sobre la fisiología y patología de la misma.

Este estudio, por tanto, abre las puertas a nuevas investigaciones que desde el rigor estadístico demuestren la existencia de un ritmo circadiano sea este de mayor o menos magnitud y que traten de descubrir la implicación de los genes a lo largo de la gestación, tanto desde un punto de vista fisiológico como patológico. En ratas, se ha visto que variaciones en la expresión génica del ritmo circadiano pueden desencadenar abortos o problemas en el desarrollo postparto (Bellavía y cols, 2006 ; Varcoe y cols., 2011). En humanos, sin embargo, hay evidencias indirectas, pero no hay ningún artículo que relacione mutaciones de los genes con sus consecuencias reproductivas ni su influencia sobre el desarrollo del feto.



# CONCLUSIONES

Del presente trabajo se han extraído las siguientes conclusiones:

## **PRIMERA**

Por primera vez, se ha demostrado que los genes reloj seleccionados, *Clock*, *Cry1* y *Per2*, se expresan en la placenta humana a término.

## **SEGUNDA**

No sólo se expresan dichos genes, sino que muestran un patrón rítmico dependiente de la hora del día.

## **TERCERA**

Los patrones de expresión de los genes *Cry1* y *Per2* son similares entre sí, y diferentes respecto a los del gen *Clock*.

## Bibliografía

### A

Albrecht, U., Zheng, B., Larkin, D., Sun, Z.S. and Lee, C.C. *Mper1 and Mper2 are essential for normal resetting of the circadian clock*. Journal of Biological Rhythms. 2001. **16**(2):100-104.

### B

Bae, K. and Weaver, D.R. *Light-induced phase shifts in mice lacking mper1 or mper2*. Journal of Biological Rhythms. 2003. **18**:123-13.

Balsalobre, A., Damiola, F. and Schibler, U. *A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells*. Cell. 1998. **93**:929-937.

Bellavía, S.L., Carpentieri, A.R., Vaqué, A.M., Macchione, A.F. and Vermouth, N.T. *Pup circadian rhythm entrainment-effect of maternal ganglionectomy or pinealectomy*. Physiology and behavior. 2006. **89**(3):342-9.

Bisanti, L., Olsen, J., Basso, O., Thonneau, P. and Karmaus, W. *Shift work and subfecundity: a European multicenter study on infertility and subfecundity*. Occupational and Environmental Medicine. 1996. **38**(4):352–358.

Boden, M.J. and Kennaway, D.J. *Circadian rhythms and reproduction*. Reproduction. 2006. **132**:379-392.

Boden, M.J. and Kennaway, D.J. *Reproductive consequences of circadian dysfunction: fertility in the Bmal1 null mouse*. Reproduction Fertility and Development. 2004. **16**:280-280.

Boden, M.J. and Kennaway, D.J. *Reproduction in the arrhythmic Bmal1 knockout mouse*. Reproduction, Fertility and Development. 2005. **17**:126-126.

Borjigin, J., Samantha Zhang, L. and Calinescu, A.A. *Circadian regulation of pineal gland rhythmicity*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011. **349**(1):13-19.

Bunger, M.K., Wilsbacher, L.D., Moran, S.M., Clendenin, C., Radcliffe, L.A., Hogenesh, J.B., Simon, M.C., Takahashi, J.S. and Bradfield, C.A. *Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals*. *Cell*. 2000. **103**(7):1009-1017.

## C

Cahill, D.J., Wardle, P.G., Harlow, C.R. and Hull, M.G. *Onset of the preovulatory luteinizing hormone surge: diurnal timing and critical follicular prerequisites*. *Fertility and Sterility*. 1998. **70**:56-59.

Cermakian, N., Monaco, L., Pando, M.P., Dierich, A. and Sassone-Corsi, P. *Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the *Period1* gene*. *EMBO journal*. 2001. **20**(15):3976-3974.

Chappell, P.E., White, R.S. and Mellon, P.L. *Circadian gene expression regulates pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretory patterns in the hypothalamic GnRH-secreting GT1-7 cell line*. *Journal of Neuroscience*. 2003. **23**:11202-11213.

Cheng, Y., Gvakharia, B. and Hardin, P.E. *Two Alternatively Spliced Transcripts from the *Drosophila period* Gene Rescue Rhythms Having Different Molecular and Behavioral Characteristics*. *Molecular and Cellular Biology*. 1998. **18** (11): 6505–6514.

## D

Davidson, A.J., Castañón-Cervantes, O. and Stephan, F.K. *Daily oscillations in liver function: diurnal vs circadian rhythmicity*. *Liver international*. 2004. **24**(3):179-186.

De la Iglesia, H. *Relojes Moleculares*. En: Cronobiología Básica y Clínica. Madrid, J.A. y Rol de Lama, A. Edite@red. 2006.

De Lia, J.E. *Desarrollo placentario y fetal*. En: Tratado de obstetricia y ginecología, de Danforth. Scott, J.R., DiSaia, P.J., Hammond, C.B., Spellacy, W.N. 6ª Edición. Ed. Interamericana, McGraw-Hill. 1994.

Dickmeis, T. *Glucocorticoids and the circadian clock*. Journal of Endocrinology. 2009. **200**:3-22.

## E

Emery, P., Stanewsky, R., Helfrich-Förster, C., Emery-Le, M., Hall, J.C. and Rosbash, M. *Drosophila CRY is a deep brain circadian photoreceptor*. Neuron. 2000. **26** (2): 493–504.

Escobar, C., Mendoza, J.Y. y Ángeles-Castellanos, M. *Fisiología de los osciladores periféricos. Sincronización por el alimento*. En: Cronobiología Básica y Clínica. Madrid, J.A. y Rol de Lama, A. Edite@red. 2006.

## F

Firsov, D., Tokonami, N. and Bonny, O. *Role of the renal circadian timing system in maintaining water and electrolytes homeostasis*. Molecular and Cellular Endocrinology. 2012. **349**(1):51-55.

Fortuny, A. y Gonzalez Gomez, F. *Funciones de la placenta*. En: Obstetricia. 4ª Edición. Ed. Masson. 1995.

Frigato, E., Lunghi, L., Ferreti, M.E., Biondi, C. and Bertolucci, C. *Evidence for circadian rhythms in human trophoblast cell line that persist in hypoxia*. Biochemical and biophysical research communications. 2009. **378**:108-111.

## G

Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S. and Weitz, C.J. *Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism*. Science. 1998. **280**:1564-1569.

Gillespie, J.M., Chan, B.P., Roy, D., Cai, F. and Belsham, D.D. *Expression of circadian rhythm genes in gonadotropin-releasing hormone-secreting GT1-7 neurons*. *Endocrinology*. 2003. **144**:5285-5292.

Golombek, D.A y Yannielli, P.C. *Organización del sistema circadiano en vertebrados*. En: *Cronobiología Básica y Clínica*. Madrid, J.A. y Rol de Lama, A. Ed. Edite@red. 2006.

Gonzalez-Merlo, J. y Escudero, M. *Desarrollo y estructura de la placenta, membranas ovulares y líquido amniótico*. En: *Obstetricia*. 4ª Edición. Ed. Masson. 1995.

Gozeri, E., Celik, H., Ozercan, I., Gurates, B., Poltat, S.A. and Hanay, F. *The effect of circadian rhythm changes on fetal and placental development*. *Neuroendocrinology Letters*. 2008. **29**(1):87-90.

Griffin, E.A., Staknis, D. and Weitz, C.J. (October 1999). *Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock*. *Science*. 1999. **286** (5440): 768–771.

## H

Hamatani, T. *Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development*. *Developmental Cell*. 2004. **6**:117-131.

Hastings, M., O'Neill, J.S. and Maywood, E.S. *Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms*. *Journal of Endocrinology*. 2007. **195**:187-198.

Herzog, E.D., Grace, M.S., Harrer, C., Williamson, J., Shinohara, K. and Block, G.D. *The role of Clock in the developmental expression of neuropeptides in the suprachiasmatic nucleus*. *Journal of Comparative Neurology*. 2000. **424**:86-98.

Hogenesch, J.B., Chan, W.K., Jackiw, V.H., Brown, R.C., Gu, Y.Z., Pray-Grant, M., Perdew, G.H. and Bradfield, C.A. *Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway*. The Journal of biological Chemistry. 1997. **272**(13):8581-8593.

## I

Ikeda, M. and Nomura, M. *cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1997. **233** (1): 258–64.

Ikegami, K. and Yoshimura, T. *Circadian clocks and the measurement of daylength in seasonal reproduction*. Molecular and Cellular Endocrinology. 2012. **349**(1):76-81.

## J

Johnston, J.D. *Adipose circadian rhythms: translating cellular and animal studies to human physiology*. Molecular and Cellular Endocrinology. 2011. **349**(1):45-50.

Johnson, M.H., Lim, A., Fernando, D. and Day, M.L. *Circadian clockwork genes are expressed in the reproductive tract and conceptus of the early pregnant mouse*. Reproductive Biomedicine Online. 2002. **4**:140-145.

## K

Katzenberg, D., Young, T., Finn, L., Lin, L., King, D.P., Takahashi, J.S. and Mignot, E. *A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference*. Sleep. 1998. **21**(6):569-76.

Kennaway, D.J., Varcoe, T.J. and Mau, V.J. *Rhythmic expression of clock and clock-controlled genes in the rat oviduct*. Molecular Human Reproduction. 2003. **9**:503-507.

Kennaway, D.J. *The role of circadian rhythmicity in reproduction*. Human Reproduction. 2005. **11**(1):91-101.

Kennaway, D.J., Boden, M.J. and Varcoe, T.J. *Circadian rhythms and fertility*. Molecular and Cellular Endocrinology. 2012a. **349**(1):56-61.

Kennaway, D.J. and Varcoe, T.J. *Foreword*. Molecular and Cellular Endocrinology. 2012b. **349**:1-2.

Kerdelhue, B., Brown, S., Lenoir, V., Queenan, J.T.J., Jones, G.S., Scholler, R. and Jones, H.W.J. *Timing of initiation of the preovulatory luteinizing hormone surge and its relationship with the circadian cortisol rhythm in the human*. Neuroendocrinology. 2002. **75**:158-163.

King, D.P., Vitaterna, M.H., Chang, A.M., Dove, W.F., Pinto, L.H., Turek, F.W. and Takahashi, J.S. *The mouse Clock mutation behaves as an antimorph and maps within the W19H deletion, distal of kit*. Genetics. 1997a. **146**:1049-1060.

King, D.P., Zhao, Y., Sangoram, A.M., Wilsbacher, L.D., Tanaka, M., Antoch, M.P., Steeves, T.D., Vitaterna, M.H., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., Turek, F.W. and Takahashi, J.S. *Positional cloning of the mouse circadian clock gene*. Cell. 1997b. **89**(4):641-653.

Klarsfeld, A., Malpel, S., Michard-Vanhée, C., Picot, M., Chélot, E. and Rouyer, F. *Novel features of cryptochrome-mediated photoreception in the brain circadian clock of Drosophila*. The Journal of Neuroscience. 2004. **24** (6): 1468–77.

Kobayashi, K., Kanno, S., Smit, B., van der Horst, G.T., Takao, M. and Yasui, A. *Characterization of photolyase/blue-light receptor homologs in mouse and human cells*. Nucleic Acids Research. 1998. **26**(22): 5086–92.

Konopka, R.J. and Benzer, S. *Clock Mutants of Drosophila melanogaster*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1971. **68**(9):2112-2116.

## L

Laborda, J. *Obesos a destiempo*. Jorlab.blogspot.com. 17 Febrero, 2013.

Laposky, A., Easton, A., Dugovic, C., Walisser, J., Bradfield, C. and Turek, F. *Deletion of the mammalian circadian clock gene Bmal1/-Mop3 alters baseline sleep architecture and the response to sleep deprivation*. Sleep. 2005. **28**:395-409.

Logan, R.W. and Sarkar, D.K. *Circadian nature of immune function*. Molecular and Cellular Endocrinology. 2012. **349**(1):82-90.

Low-Zeddies , S.S. and Takahashi, J.S. *Chimera analysis of the Clock mutation in mice shows that complex cellular integration determines circadian behavior*. Cell. 2001. **105**:25-42.

Mahoney, M.M. *Shift work, jet lag, and female reproduction*. International Journal of endocrinology. 2010. **2010**:813764.

Miller, B.H., Olson, S.L., Turek, F.W., Levine, J.E., Horton, T.H. and Takahashi, J.S. 2004. *Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy*. Current Biology. 2004. **14**(15):1367-73.

Morris, C.J., Aeschbach, D. and Scheer, F.A.J.L. *Circadian system, sleep and endocrinology*. Molecular and Cellular Endocrinology. 2012. **349**(1): 91–104.

## N

Noshiro, M., Furukawa, M., Homma, S., Kawamoto, T., Hamada, T., Honna, K. and Kato, Y. *Tissue-specific disruption of rhythmic expression of Dec1 and Dec2 in clock mutant mice*. Journal of Biological Rhythms. 2005. **20**:404-418.



## O

Oishi, K., Fukui, H. and Ishida, N. *Rhythmic expression of BMAL1 mRNA is altered in clock mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2000. **268**:164-171.

Oishi, K., Miyazaki, K., Kadota, K., Kikuno, R., Nagase, T., Atsumi, G.I., Ohkura, N., Azama, T., Mesaki, M., Yukimasa, S., Kobayashi, H., Iitaka, C., Umehara, T., Horikoshi, M., Kudo, T., Shimizu, Y., Yano, M., Monden, M., Machida, K., Matsuda, J., Horie, S., Todo, T. and Ishida, N. *Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes*. Journal of Biological Chemistry. 2003. **278**:41519-41527.

Olcese, J., Domagalski, R., Bednorz, A., Weaver, D.R., Urbanski, H.F., Reuss, S. and Middendorff, R. *Expression and regulation of mPer1 in immortalized GnRH neurons*. Neuroreport. 2003. **14**:613-618.

Olcese, J. *Circadian aspects of mammalian parturition: A review*. Molecular and Cellular Endocrinology. 2012. **349**(1):62-67.

Oster, H., Yasui, A., van der Horst, G.T. and Albrecht, U. *Disruption of mCry2 restores circadian rhythmicity in mPer2 mutant mice*. Genes and Development. 2002. **16**: 2633-2638.

Oster, H., Baeriswyl, S., van der Horst, G.T. and Albrecht, U. *Loss of circadian rhythmicity in aging mper1<sup>-/-</sup>mcry2<sup>-/-</sup>mutant mice*. Genes and Development. 2003. **17**:1366-1379.

## R

Ratajczak, C.K., Herzog, E.D. and Muglia, L.J. *Clock gene expression in gravid uterus and extra-embryonic tissues during late gestation in the mouse.*

Reproduction, Fertility and Development. 2010. **22**:743-750.

Reddy,P., Zehring, W.A., Wheeler, D.A., Pirrotta, V., Hadfield, C., Hall, J.C. and Rosbash, M. *Molecular analysis of the period locus in Drosophila melanogaster and identification of a transcript involved in biological rhythms.* 1984. Cell. **38** (3): 701–10.

Reppert, S.M. and Weaver, D.R. *Coordination of circadian timing in mammals.* Nature. 2002. **418** (6901): 935–941.

## S

Sack, R.L., Auckley, D., Auger, R.R., Carskadon, M.A., Wright, K.P, Vitiello, M.V and Zhdanova, I.V. *Circadian rhythm sleep disorders: part I, basic principles, shift work and jet lag disorders. An American Academy of Sleep Medicine review.* Sleep. 2007. **30**(11):1460-83.

Sakai, N. and Endo, A. *Effects of delayed mating on preimplantation embryos in spontaneously ovulated mice.* Gamete Research. 1988. **19**(4):381-385.

Schmutz, I., Albrecht,U. and Ripperger, J.A. *The role of clock genes and rhythmicity in the liver.* Molecular and Cellular Endocrinology. 2012. **349**:38-44.

Seron-Ferre, M., Mendez, N., Abarzua-Catalan, L., Vilches, N., Valenzuela, F.J., Reynolds, H.E., Lalanos, a.J., Rojas,A., Valenzuela,G.J. and Torres-Farfan, C. *Circadian rhythms in the fetus.* Molecular and Cellular Endocrinology. 2012. **349**(1):68-75.

Shi, M. and Zheng, X. *Interactions between the circadian clock and metabolism: there are good times and bad times.* Acta Biochim Biophys Sin. 2013. **45**:61-69.

Silva, F. *Trastornos del Ritmo Circadiano del Sueño: fisiopatología, clasificación y tratamientos*. Memoriza.com. 2010. **7**:1-13.

## T

Tei, H., Okamura, H., Shigeyoshi, Y., Fukuhara, C., Ozawa, R., Hirose, M. and Sakaki, Y. *Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene*. Nature. 1997. **389**:512-516.

Thresher, R.J., Vitaterna, M.H., Miyamoto, Y., Kazantsev, A., Hsu, D.S., Petit, C., Selby, C.P., Dawut, L., Smithies, O., Takahashi, J.S. and Sancar, A. *Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses*. Science. 1998. **282** (5393):490-1494.

Todo, T., Ryo, H., Yamamoto, K., Toh, H., Inui, T., Ayaki, H., Nomura, T. and Ikenaga, M. *Similarity among the Drosophila (6-4) photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family*. Science. 1996. **272**(5258): 109–12.

Tonsfeldt, K.J. and Chappell, P.E. *Clocks on top: The role of circadian clock in the hypothalamic and pituitary regulation of endocrine physiology*. Molecular and Cellular Endocrinology .2012. **394**(1):3-12.

## V

Van der Horst, G.T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A.P., van Leenen, D. Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, JH. And Yasui, A. *Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms*. Nature. 1999. **398** (6728): 627-630.

Van der Spek, P.J., Kobayashi, K., Bootsma, D., Takao, M., Eker, A.P. and Yasui, A. *Cloning, tissue expression, and mapping of a human photolyase homolog with similarity to plant blue-light receptors*. Genomics. 1996. **37**(2):177–82.

Varcoe, T.J., Wight, N., Voultios, A., Salked, M.D. and Kennaway, D.J. *Chronic phase shifts of the photoperiod throughout pregnancy programs glucose intolerance and insulin resistance in the rat*. PLoS ONE. 2011. **6**(4): e18504.

Vermesh, M. *Monitoring techniques to predict and detect ovulation*. Fertility and Sterility. 1987. **47**:259-264.

Vielhaber, E., Eide, E., Rivers, A., Gao, Z.H. and Virshup, D.M. *Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon*. Molecular Cell Biology. 2000. **20**(13):4888–99.

Vitaterna, M.H., Selby, C.P., Todo, T., Niwa, H., Thompson, C., Fruechte, E.M., Hitomi, K., Thresher, R.J., Ishikawa, T., Miyazaki, J., Takahashi, J.S. and Sancar, A. *Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999. **96** (21):12114-12119.

## W

Waddell, B.J., Wharfe, M.D., Crew, R.C. and Mark, P.J. *A rhythmic placenta? Circadian variation, clock genes and placental function*. Placenta. 2012. **33**(7): 533-539.

Wharfe, M.D., Mark, P. J. and Waddell, B.J. *Circadian Variation in Placental and Hepatic Clock Genes in Rat Pregnancy*. Endocrinology. 2011. **152**(9):3552-3560.

Wilcox, A.J., Weinberg, C.R. and Baird, D.D. *Timing of sexual intercourse in relation to ovulation. Effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby*. New England Journal of Medicine. 1995. **333**:1517-1521.

## Z

Zheng, B., Larkin, D.W., Albrecht, U., Sun, Z.S., Sage, M., Eichele, G., Lee, C.C. and Bradley, A. 1999. *The mper2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock*. Nature. 1999. **400** (6740):169-173.