



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

“El Glu regula traduccionalmente a la proteína BMAL1 en cultivos primarios de BGC”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
Doctora en Ciencias Biomédicas

PRESENTA:

Q.F.B. Lizbeth Donají Chi Castañeda

Directora de tesis:

Dra. Rossana Citlali Zepeda Hernández

Co-director de tesis:

Dr. Arturo Ortega Soto

Xalapa, Ver.

Octubre 2015

Becario CONACYT No. 249758

Esta tesis fue realizada bajo la dirección de la Dra. Rossana Zepeda Hernández y la co-dirección del Dr. Arturo Ortega Soto, en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Veracruzana; así como, en el Laboratorio 31 del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, con el apoyo financiero de CONACYT-México para A.O. (79502 y 123625) y la Fundación Pandeia. Además del recurso del programa de becas para estudios de posgrado otorgado por CONACYT, teniendo el número de becario 249758.

COMITÉ EVALUADOR

Dra. Rossana Citlali Zepeda Hernández

Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana.

Dr. Arturo Ortega Soto

Depto. de Toxicología, CINVESTAV México-D.F.

Dra. Alma Vázquez Luna

Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana.

Dra. Clara Luz Sampieri Ramírez

Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana.

Dra. Elvira Morgado Viveros

Facultad de Biología, Universidad Veracruzana.

Dr. Stefan Marian Waliszewski Kubiak

Instituto de Medicina Forense, Universidad Veracruzana.

Dr. Francisco Castelán

Biología de la Conducta, Centro Tlaxcala, Universidad Autónoma de
Tlaxcala.

“Un científico es un hombre tan endeble y humano como cualquiera; sin embargo, la búsqueda científica puede ennoblecerle, incluso en contra de su voluntad.”

Isaac Asimov

DEDICATORIAS

Este trabajo de tesis está dedicado a mis padres, mis abuelos, mi hermana y a mi novio; por todo el apoyo, la comprensión y el cariño que me han demostrado en cada momento de mi vida.

Gracias!

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mis padres: Sra. Eddy y Sr. David, por esforzarse cada día en darme lo mejor y que nunca me falte nada. Por su paciencia, sabiduría, comprensión y sobre todo, por su amor incondicional.

A mi hermana Vianey, por su sinceridad, complicidad y principalmente, por compartir cada momento conmigo.

A mi novio Eduardo, porque a pesar de la distancia, siempre estuviste conmigo; por tu comprensión, consejos y palabras de aliento en los días más difíciles. Por ser mi amigo y compañero inseparable.

A toda mi familia, que es lo más valioso que Dios me ha dado y que me acompañaron durante todo este esfuerzo para arribar a la meta.

A mis suegros: Sra. NellyCe y Sr. Marcelino, por su apoyo, complicidad y palabras de aliento.

A mis amigos y compañeros de la tercera generación del Doctorado en Ciencias Biomédicas, por su amistad y apoyo (Montserrat, Lulú, Azucena, Alan, Daniel, Soledad, y Aracely).

A mis compañeros y amigos del laboratorio 31 del departamento de Toxicología en el CINVESTAV, por su amistad, gran ayuda y aprendizajes (Marco, Beto, Edna, Orquidia, Clara, Luis, Blanca).

A mi co-tutor de tesis, el Dr. Arturo Ortega, quien confió en mí, me alentó a seguir adelante y me guió certeramente a transitar el camino para conquistar esta aspiración profesional.

A mi comité tutorial y comité evaluador, por sus observaciones, sugerencias, consejos, aprendizajes; así como, por darse el tiempo de revisar este escrito.

ÍNDICE	PÁGINA
ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	i
LISTA DE ABREVIATURAS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Arquitectura del cerebelo	4
2.1.1 Generalidades de la glía de Bergmann	6
2.2 El glutamato como neurotransmisor	8
2.2.1 Estructura y clasificación de los receptores glutamatérgicos	9
2.2.2 Estructura y función de los transportadores de glutamato	12
2.3 Ritmos biológicos	14
2.3.1 Parámetros que definen un ritmo biológico	15
2.3.2 Clasificación de los ritmos biológicos	16
2.3.3 Propiedades fundamentales de los ritmos circadianos	17
2.3.4 Fisiología de los ritmos circadianos	18
2.3.5 Regulación molecular de los ritmos circadianos	20
2.3.6 Relojes periféricos o esclavos	22
2.4 Conformación y modificaciones post-traduccionales de BMAL1	24
2.4.1 Fosforilación de BMAL1	26
2.4.2 Sumoilación, acetilación y ubiquitinación de BMAL1	27
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	31
5. OBJETIVOS	31
5.1 Objetivo general	31
5.2 Objetivos específicos	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1 Animales	32
6.2 Cultivos primarios de BGC	32
6.3 Extractos nucleares de BGC	32
6.4 Determinación de la concentración de proteínas	33
6.5 Detección de BMAL1 por inmunodetección en fase sólida	33
6.6 Inmunoprecipitación de BMAL	34

6.7 Análisis estadístico	34
7. RESULTADOS	35
7.1 Expresión de BMAL1 en BGC	35
7.2 La expresión de BMAL1 es tiempo- y dosisdependiente de Glu	36
7.3 Caracterización farmacológica de la expresión de BMAL1 dependiente de Glu	37
7.4 El Glu estabiliza a la proteína BMAL1	40
7.5 La expresión de BMAL1 es regulada a través de las proteínas PKA y PKC	43
8. DISCUSIÓN	45
9. CONCLUSIONES DE LOS OBJETIVOS PARTICULARES	47
10. CONCLUSIÓN DE LA TESIS	47
11. MODELO PROPUESTO DE LA REGULACIÓN DE BMAL1 DEPENDIENTE DE Glu	48
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
13. ANEXOS	58
13.1 Artículo de divulgación científica	59
13.2 Artículo científico	68

ÍNDICE DE TABLAS

NÚMERO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Tabla 1	Características y distribución de los iGluRs	11

ÍNDICE DE FIGURAS

NÚMERO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Figura 1	Citoarquitectura del cerebelo	5
Figura 2	Variedad de células gliales	7
Figura 3	Estructura de los iGluRs	10
Figura 4	Estructura de los mGluRs	12
Figura 5	Principales parámetros que definen un ritmo biológico	16
Figura 6	Modelo del reloj molecular en mamíferos	21
Figura 7	Esquema general de los mecanismos de transducción de señales implicados en la sincronización circadiana	23
Figura 8	Representación esquemática de los dominios funcionales presentes en la proteína BMAL1 de <i>Mus musculus</i>	25
Figura 9	Las proteínas reloj son blanco de una gran variedad de modificaciones post-traduccionales	26
Figura 10	BMAL1 se expresa en BGC	35
Figura 11	La expresión de BMAL1 es dependiente de tiempo de estimulación con Glu	36
Figura 12	La expresión de BMAL1 es dependiente de dosis de Glu	37
Figura 13	Los receptores de Glu participan en la expresión de BMAL1 inducida por Glu	38
Figura 14	Los receptores AMPA y mGluRs median la respuesta del Glu en la expresión de BMAL1	39
Figura 15	GLAST participa en la expresión de BMAL1 dependiente de Glu	40
Figura 16	El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ está implicado en la expresión de BMAL1 inducida por Glu	41
Figura 17	El Glu estabiliza a la proteína BMAL1	42
Figura 18	PKA y PKC participan en la regulación de la expresión de BMAL1	43
Figura 19	Modelo de la regulación de BMAL1 dependiente de Glu en BGC	48

LISTA DE ABREVIATURAS*

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ATP	Adenosín trifosfato
BGC	Células de glía de Bergmann
<i>Bmal1</i>/BMAL1	Nombre del gen/nombre de la proteína correspondiente al gen Receptor nuclear del translocador para aril hidrocarburos de la proteína 1 semejante a ARNT en cerebro y músculo
BSA	Albúmina sérica bovina
<i>Clock</i>/CLOCK	Nombre del gen/nombre de la proteína correspondiente al gen Ciclos de terminación de salida de locomoción circadiana
<i>Cry</i>/CRY	Nombre del gen/nombre de la proteína correspondiente al gen Criptocromo
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
DTT	Ditiotreitol
EAAT	Transportadores de aminoácidos excitadores
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido tetraacético del etilenglicol
GABA	Ácido gamma amino butírico
GLAST	Transportador de glutamato-aspartato
Gln	Glutamina
GLT1	Transportador 1 glial de glutamato
Glu	Glutamato
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas ligadas a GTP
GTP	Guanosín trifosfato
iGluR	Receptores de glutamato de tipo ionotrópico
KA	Ácido kaínico
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
mGluR	Receptores de glutamato de tipo metabotrópico
NMDA	N-metil-D-aspartato
NSQ	Núcleo supraquiasmático
<i>Per</i>/PER	Nombre del gen/nombre de la proteína correspondiente al gen Periodo
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema nervioso central

*De acuerdo con los nombres que reciben en el idioma inglés

RESUMEN

El glutamato, el principal aminoácido excitador, activa una gran variedad de cascadas de transducción de señales. Este neurotransmisor está involucrado en la sincronización fónica de los ritmos circadianos, los cuales regulan funciones fisiológicas y conductuales. El reloj circadiano en los vertebrados, el núcleo supraquiasmático, está basado en un asa de retroalimentación de transcripción-traducción, en el cual la proteína BMAL1 actúa como un activador transcripcional de otros genes reloj. Esta proteína se expresa en casi todas las neuronas del núcleo supraquiasmático, y otras regiones cerebrales y periféricas. El objetivo del estudio fue investigar la función del glutamato en los mecanismos moleculares implicados en los procesos de transcripción/traducción de la proteína BMAL1. Para este fin, cultivos primarios de células gliales de Bergmann de cerebelo de *Gallus gallus* fueron estimulados con ligandos glutamatérgicos, los resultados indican que los niveles de BMAL1 aumentan en una manera dosis y tiempo dependiente. Adicionalmente, se estudia la fosforilación en residuos de serina de BMAL1 bajo el estímulo de glutamato y los resultados demuestran un aumento en la fosforilación de esta proteína. El aumento en la expresión de BMAL1 es probablemente el resultado de su estabilización después de haber sido fosforilada por la proteína cinasa dependiente de AMPc y/o de la proteína cinasa dependiente de Ca^{+2} /diacilglicerol. Los resultados sugieren fuertemente que el glutamato regula traduccionalmente a BMAL1 en las células gliales, y que estas células son importantes para la regulación de los ritmos circadianos en el cerebelo.

ABSTRACT

Glutamate, the major excitatory amino acid, activates a wide variety of signal transduction cascades. This neurotransmitter is involved in photic entrainment of circadian rhythms, which regulate physiological and behavioral functions. The circadian clock in vertebrates, suprachiasmatic nucleus, is based on a transcription-translation feedback loop, in which BMAL1 protein acts as transcriptional activator of others clock genes. This protein is expressed in nearly all suprachiasmatic nucleus neurons, and other brain and peripheral regions. This study aimed was to investigate the role of glutamate in the molecular mechanisms involved in the processes of transcription/translation of BMAL1 protein. To get this goal, primary cultures of *Gallus gallus* cerebellar Bergmann glial cells were stimulated with glutamatergic ligands, the results indicate that BMAL1 levels increased in a dose- and time dependent manner. Additionally, the phosphorylation of serine residues in BMAL1 under glutamate stimulation is studied and the results shown an increase in the phosphorylation of this protein. The increased expression of BMAL1 is most probably the result of its stabilization after being phosphorylated by the cyclic AMP-dependent protein kinase and/or the Ca^{2+} /diacylglycerol dependent protein kinase. The results strongly suggest that glutamate regulates translationally to BMAL1 in glial cells, and that these cells are important for the regulation of circadian rhythms in the cerebellum.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso, uno de los más complejos e importantes del organismo, comprende una red de estructuras especializadas responsable de coordinar e integrar todas las funciones del organismo. Para ello, el sistema nervioso selecciona información de origen externo e interno a través de receptores sensoriales, transmite e integra la información que recibe, permite la toma de decisiones y canaliza la información hacia órganos o tejidos específicos, almacena información que puede ser recuperada cuando es requerida, se puede modificar estructural y funcionalmente frente a los cambios y estímulos, lo cual contribuye al aprendizaje (Purves et al., 2012). Anatómicamente, el sistema nervioso está dividido en: sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC está conformado por el encéfalo (cerebro, cerebelo y tallo cerebral) y la médula espinal, se encarga de integrar y relacionar la información sensitiva aferente, en él se generan los pensamientos, las emociones, y se forma y almacena la memoria; mientras que el SNP, está integrado por 12 nervios craneales y 31 nervios espinales, ambos nervios se encuentran distribuidos por todo el organismo y llevan impulsos nerviosos desde y hasta el SNC (Purves et al., 2012).

Las neuronas son reconocidas como los elementos celulares responsables del procesamiento de información del sistema nervioso, gracias a una de sus propiedades fundamentales, la excitabilidad eléctrica, que constituye el sustrato biofísico de la codificación de información neuronal. Estas células transfieren la información entre ellas a través de contactos funcionales entre neuronas, las sinapsis. De acuerdo al mecanismo de transmisión sináptica, la sinapsis puede ser eléctrica o química. En la sinapsis eléctrica, la corriente iónica fluye a través de uniones gap, los cuales son canales especializados de membrana que conectan de forma directa a dos células. En contraste, la sinapsis química permite la comunicación célula-célula mediante la secreción de neurotransmisores; en este caso, las sustancias químicas liberadas por la neurona presináptica producen un flujo de corriente secundaria en la neurona postsináptica mediante la activación de receptores moleculares específicos, representando la principal forma de comunicación en el sistema nervioso (Purves et al., 2012).

Las células de glía constituyen otro tipo de células fundamentales del sistema nervioso. Este tipo de células realiza una gran cantidad de tareas como: la producción de la vaina de mielina, la captura rápida e inactivación de neurotransmisores químicos liberados por las neuronas, la formación de tejido cicatricial después de lesiones cerebrales, el soporte mecánico de las neuronas, la eliminación de residuos de tejido local después de la muerte celular, entre otros (Jessen, 2004; Purves et al., 2012). La estructura de la glía del sistema nervioso, así como la relación entre el número de sus células y el de sus neuronas varía de unas zonas a otras (Jessen, 2004; Purves et al., 2012).

En el SNC de vertebrados, el ácido glutámico o glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor excitador. Está presente en prácticamente todas las áreas del cerebro y sus receptores se encuentran ampliamente distribuidos y expresados en la mayoría de las células gliales del cerebro. Dentro del SNC, el Glu no se limita a mediar la neurotransmisión excitadora sino que presenta un gran número de funciones adicionales como: modular el crecimiento axonal y la formación de sinapsis, producir cambios en la actividad metabólica, la expresión génica y la síntesis de proteínas; actuar como un estímulo quimiotáctico durante la sinaptogénesis y el desarrollo embrionario, entre otras funciones (Michaelis, 1998). La transmisión glutamatérgica está presente en el cerebelo, una estructura cerebral fundamental en el control del movimiento, el equilibrio y el aprendizaje motor (Delgado-García, 2001).

El cerebelo, al igual que otras estructuras cerebrales, forma parte de una red de osciladores circadianos en el cerebro de mamífero. Particularmente, el cerebelo es un oscilador esclavo (Guilding y Piggins, 2007), el cual exhibe su propio ritmo de oscilación pero es sincronizado por el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo, el reloj biológico maestro en vertebrados (Moore y Eichler, 1972). Este núcleo coordina un grupo de ritmos biológicos denominados ritmos circadianos (del latín *circa*, cerca de y *dies*, día), los cuales oscilan con un periodo cercano a las 24 horas, regulando la mayoría de los procesos conductuales y fisiológicos como la temperatura, el ciclo sueño/vigilia, la secreción de hormonas, entre otros (Menna-Barreto, 1999). La naturaleza endógena de esos ritmos indica la existencia de un sistema capaz de medir el tiempo con gran precisión (Pittendrigh, 1993).

El sistema circadiano de los vertebrados posee varios osciladores que se organizan de forma jerárquica, de tal modo que el NSQ es responsable de la sincronización directa e indirecta de una variedad de osciladores o relojes periféricos en las células que integran diferentes tejidos y órganos (Stratmann y Schibler, 2006; Chung et al., 2011; Kampf-Lassin et al., 2011). Este núcleo es principalmente sincronizado por los ciclos de luz-oscuridad. Por el contrario, los osciladores periféricos pueden ser fuertemente afectados por otros sincronizadores o *zeitgebers* tales como ciclos de alimentación, temperatura, ruido, entre otros (Pittendrigh y Daan, 1976; Albers et al., 1992; Abraham et al., 2010).

A nivel molecular, tanto en el NSQ como en los osciladores periféricos y en todas las células del organismo, el mecanismo del reloj circadiano es regulado a partir de asas de retroalimentación interconectadas en la expresión de un pequeño número de genes, denominados genes reloj, que funcionan de manera autónoma y autosostenida en las células (Dunlap, 1999; Reppert y Weaver, 2001; Yamazaki et al., 2000). Uno de los genes reloj que forma parte del asa positiva que regula los ritmos circadianos es *Bmal1*, cuya importancia radica en la regulación intracelular de Ca^{+2} en neuronas del NSQ, mantener la ritmicidad de la expresión de los genes reloj (Kondratov et al., 2006), entre otras funciones. Con todo lo anteriormente mencionado, el objetivo de este trabajo doctoral fue investigar la función del Glu en los mecanismos moleculares implicados en los procesos de transcripción/traducción de la proteína reloj BMAL1 en un modelo de cultivos primarios de células de glía de Bergmann.

2. ANTECEDENTES

2.1 Arquitectura del cerebelo

El cerebelo (*cerebellum* o cerebro pequeño) es conocido por su participación en el control y regulación motora en los vertebrados. Es una región en donde la plasticidad sináptica está presente en todo momento (Hernández-Muela et al., 2005). Estructuralmente, el cerebelo se compone de: i) fibras aferentes de la corteza cerebelosa, ii) núcleo profundo cerebelar, y iii) corteza cerebelar. El cerebelo se conecta con otras partes del SNC por medio de tres vías llamadas en conjunto pedúnculos cerebelosos (Purves et al., 2012). En particular, la corteza cerebelar contiene sustancia gris, la cual es una agrupación de somas, dendritas, terminales axonales y sinapsis neuronales rodeada de células gliales. Dicha corteza está compuesta por tres capas (Ramnani, 2006; Figura 1):

1. **La capa molecular** se encuentra integrada por las células en canasta, las células estrelladas, los árboles dendríticos de las células de Purkinje, los axones ascendentes y las fibras paralelas de las células granulares. Las células en canasta y las células estrelladas proveen un estímulo inhibitorio (GABAérgico; *γ-aminobutyric acid*, GABA) a la célula de Purkinje, teniendo a las células en canasta en sinapsis hacia el segmento inicial del axón de la célula de Purkinje y a las células estrelladas hacia las dendritas. Las células de glía de Bergmann (*Bergmann glial cells*, BGC) se encuentran rodeando las sinapsis glutamatérgica.
2. **La capa media o intermedia** contiene los cuerpos de las células de Purkinje. Estas células son de naturaleza GABAérgica y son una de las neuronas más grandes en cerebelo. Poseen un árbol dendrítico muy elaborado que se caracteriza por un gran número de espinas dendríticas. Las células de Purkinje envían proyecciones inhibitorias hacia el núcleo cerebelar profundo, y constituyen la única salida de toda la coordinación motriz en la corteza del cerebelo.
3. **La capa interna o granular** posee neuronas granulares que reciben las fibras musgosas; envían sus axones hacia la capa molecular, donde se dividen en T constituyendo las fibras paralelas, y hacen sinapsis con un gran número de dendritas de las células de Purkinje.

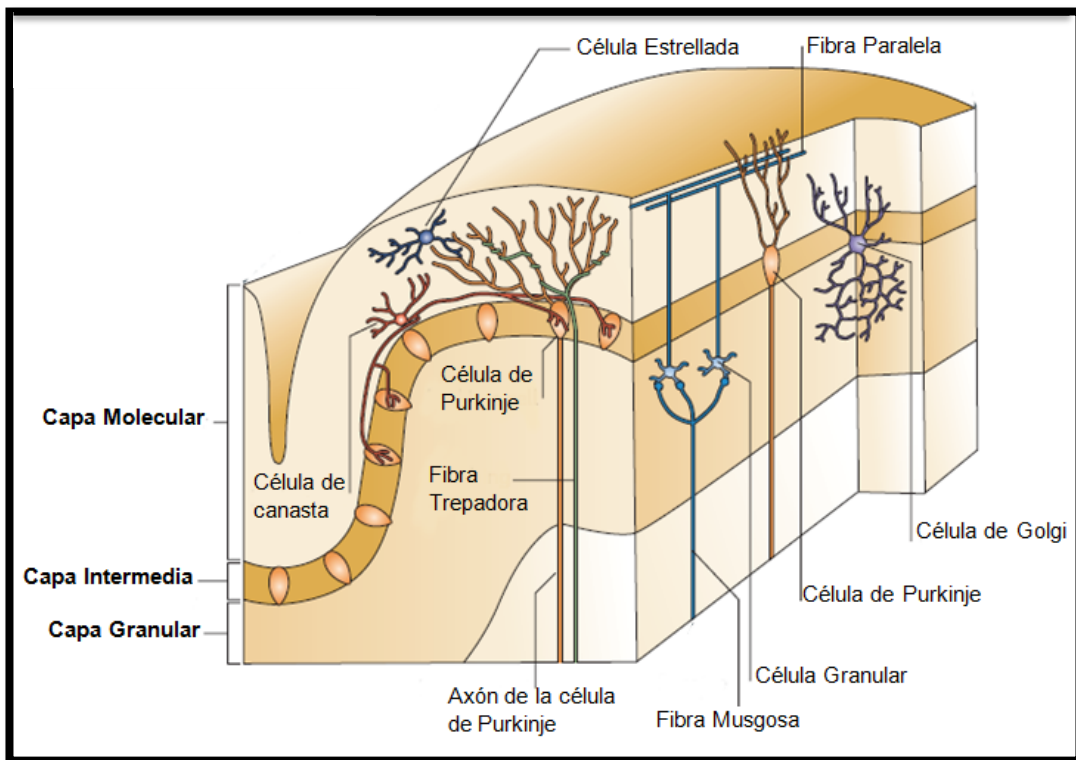


Figura 1. Citoarquitectura del cerebelo. Ilustración transversal de un lóbulo cortical cerebelar individual en donde se muestran las distintas capas del cerebelo así como las células que lo constituyen. Modificado de Ramnani, 2006.

Por debajo de la corteza cerebelar se encuentra la sustancia blanca, la cual está formada de axones miélinicos o amielínicos y oligodendrocitos; sin embargo, no contiene cuerpos celulares. En la sustancia blanca se encuentran cuatro núcleos cerebelares profundos que están dispuestos en dos grupos de núcleos interconectados: un grupo medial y caudal, que consiste en los núcleos del fastigio (medial) y globoso (interpósito posterior), y un grupo rostral y lateral, que consiste en los grupos emboliforme (interpósito anterior) y dentado. Los núcleos emboliforme y globoso están muy relacionados funcionalmente y en conjunto forman el núcleo interpósito. El núcleo del fastigio está implicado en la regulación del tono muscular, la postura y los reflejos medulares; el núcleo interpósito participa en la organización de movimientos finos; mientras que el núcleo dentado es responsable de la planificación, la iniciación y el control de los movimientos voluntarios (Delgado-García, 2001; Ramnani, 2006; Purves et al., 2012).

2.1.1 Generalidades de la glía de Bergmann

Las BGC fueron descritas por primera vez en 1846 por Rudolf Virchow, quien describió una sustancia conectiva no neuronal en el cerebro y médula espinal en la que los otros elementos del sistema nervioso (células nerviosas y fibras) estaban embebidos (Virchow, 1846). Estudios posteriores permitieron conocer y clasificar los diferentes tipos de células gliales en el sistema nervioso: la microglía y la macroglía. Las células de la microglía corresponden a macrófagos con funciones fagocíticas implicadas en procesos inflamatorios en el sistema nervioso; mientras que, la macroglía es subdividida en glía ependimal, oligodendroglía, astrogλία y células de Schwann (Figura 2). Sin embargo, de todos estos componentes de la macroglía, la astrogλία forma un grupo heterogéneo de células que presentan diferente morfología y fenotipos en distintas regiones del sistema nervioso: células de Müller en la retina, BGC en el cerebelo, astrocitos protoplásmicos localizados en la sustancia gris, astrocitos fibrosos presentes en los tractos nerviosos de la sustancia blanca y astrocitos perivasculares en contacto con los vasos sanguíneos (Reichenbach y Wolburg, 2005).

Particularmente, las BGC se encuentran situadas en la capa molecular de la corteza cerebelar de los mamíferos y proyectan varias prolongaciones celulares alargadas a través de la capa molecular hasta la superficie interna de la membrana pial, donde forman pies terminales cónicos (Bradford, 1988). Los cuerpos celulares de las BGC están localizados en la capa de células de Purkinje, permitiendo una estrecha relación con estas células hasta el punto de que sus procesos involucran casi la totalidad de las sinapsis inhibitoras y excitadoras que las células de Purkinje establecen con otras neuronas del cerebelo (Bradford, 1988).

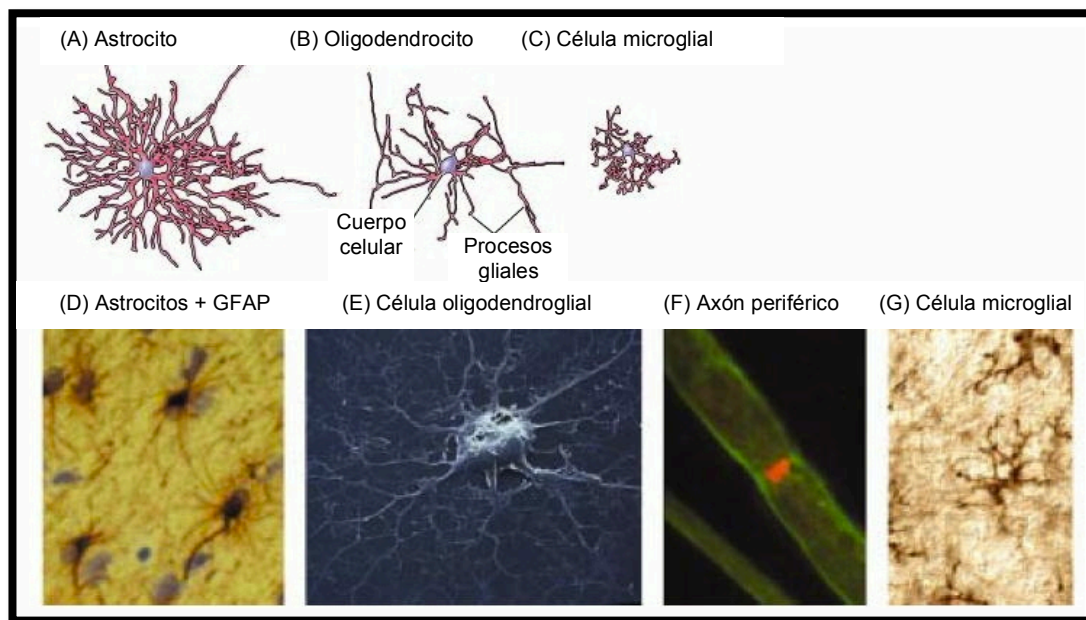


Figura 2. Variedad de células gliales. Esquemas de un astrocito (A), de un oligodendrocito (B), y de una célula microglial (C) visualizados mediante la impregnación con sales de plata. (D) Los astrocitos en el cerebro fueron marcados con el anticuerpo GFAP. Micrografía electrónica de: (E) una sola célula oligodendroglial fotografiada en cultivo de tejidos. (F) Un axón periférico rodeado por los procesos de las células de Schwann (en verde), excepto en una región distinta llamada nodo de Ranvier (en rojo). (G) Una célula microglial de la médula espinal marcada con un anticuerpo específico del tipo de célula. Modificado de Purves et al., 2012.

Las BGC son el tipo de glía más abundante en la corteza cerebelar de los vertebrados adultos, responden a la actividad neuronal, tanto a corto como a largo plazo, y son consideradas un tipo de astrocito especializado que expresa proteínas que intervienen en el acople metabólico con las neuronas (Fields y Stevens-Graham, 2002). Este tipo de célula glial se caracteriza por tener en su pericarion gran cantidad de haces de filamentos intermedios compuestos de proteína ácida fibrilar glial (*Glial fibrillar acidic protein*, GFAP), la cual tiene un peso de 51 KDa. Las BGC realizan diversas funciones importantes en el SNC: dan soporte a las neuronas, eliminan los productos de desecho del metabolismo neuronal, o de restos celulares luego de la lesión o muerte celular; forman parte de la barrera hematoencefálica que protege al SNC de cambios bruscos en la concentración de iones del líquido extracelular y de otras moléculas que pudiesen interferir en la función neural, son almacenes importantes de glucógeno y su función es esencial debido a la incapacidad de las neuronas de almacenar moléculas

enérgicas, participan en la remoción de neurotransmisores liberados en las sinapsis, entre otras funciones (Jessen, 2004; Yang et al., 2008; Purves et al., 2012).

Las BGC expresan transportadores glutamatérgicos y GABAérgicos, así como receptores de Glu de tipo mGluR (mGluR1, mGluR3 y mGluR5), NMDA (GluN1 y GluN2) y AMPA (GluA1, GluA3 y GluA4), estos receptores activan canales permeables a Ca^{+2} , Na^{+} y K^{+} , por lo que responden a tratamientos con Glu; él cual, activa diversos factores de transcripción que a su vez regulan la expresión diferencial de genes utilizando diferentes vías de señalización (López et al., 1997; López-Bayghen et al., 2003a,b).

2.2 El glutamato como neurotransmisor

La mayor parte de la neurotransmisión excitadora en el SNC de los vertebrados es mediada por el neurotransmisor Glu. Sus efectos excitadores fueron descritos en los años 50 al observar que su aplicación tópica sobre la corteza cerebral producía actividad convulsiva y que su aplicación iontoforética producía despolarización de neuronas e incremento de la frecuencia de potenciales de acción (Curtis et al., 1959).

El Glu es el aminoácido libre más abundante en el encéfalo, se encuentra cargado negativamente a pH fisiológico, casi todas las neuronas excitadoras en el SNC son glutamatérgicas, y se estima que más de la mitad de todas las sinapsis del cerebro liberan este neurotransmisor (Danbolt, 2001). Este aminoácido posee un papel importante en la síntesis de GABA efectuado en las neuronas, y de la glutamina (Gln) en los astrocitos, debido a que es el precursor inmediato de ambas sustancias. El Glu puede ser sintetizado en las terminales nerviosas a partir de α -cetoglutarato por la enzima *glutamato deshidrogenasa*, y de Gln por la enzima *glutaminasa* activada por fosfato (McKenna, 2007). El catabolismo del Glu se realiza principalmente por oxidación a través del ciclo de Krebs o por conversión de Glu en Gln mediante la enzima *glutamina sintetasa* (Fonnum, 1993). Esta enzima se encuentra localizada casi exclusivamente en las células gliales (Norenberg y Martínez-Hernández, 1979) debido a que en las neuronas existe una pequeña actividad por parte de esta enzima. La Gln glial pasa a la neurona donde vuelve a transformarse en Glu (Fonnum, 1993).

El metabolismo del Glu en el SNC se encuentra, por tanto, separado en dos compartimentos celulares: las terminaciones nerviosas y las células gliales. El Glu sintetizado en las terminaciones nerviosas es almacenado en vesículas sinápticas. El mecanismo de transporte vesicular de este neurotransmisor está acoplado a un gradiente de protones (H^+) generado por Mg^{+2} -ATPasa dirigida hacia el interior de la vesícula (Nicholls, 1993). En el citoplasma también existe un almacén de Glu. La liberación sináptica se produce por exocitosis dependiente de Ca^{+2} (Bradford, 1988).

La inactivación del Glu liberado al espacio sináptico se produce mediante la introducción de éste en las terminaciones nerviosas y en los astrocitos circundantes a través de sistemas de captura de alta afinidad y dependientes de gradientes de Na^+ y K^+ (Pocock et al., 1993). Las células gliales captan la mayor cantidad del Glu liberado (Dingledine y McBrain, 1994).

El cerebro contiene grandes cantidades de Glu (aproximadamente 5-15 mM por kg de peso húmedo dependiendo de la región); sin embargo, esta concentración aumenta drásticamente durante la neurotransmisión, por lo que una falla de los astrocitos en la remoción del exceso de Glu da lugar a la muerte neuronal en un fenómeno conocido como excitotoxicidad (McKenna, 2007).

El Glu es importante tanto en las etapas de desarrollo temprano como en el organismo adulto, produciendo cambios en la expresión génica y la síntesis de proteínas, participando en la migración, diferenciación celular y formación de sinapsis (Michaelis, 1998); así como, en distintos fenómenos de plasticidad neuronal como: la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) (Mattson, 2008).

2.2.1 Estructura y clasificación de los receptores glutamatérgicos

El Glu ejerce su efecto a través de su interacción con receptores ubicados en las neuronas presinápticas y postsinápticas así como en la glía circundante en la sinapsis. Esta interacción con receptores puede ser de dos tipos: con receptores ionotrópicos (iGluRs) o receptores metabotrópicos (mGluRs) (Bleakman et al., 2006; Chen et al., 2007).

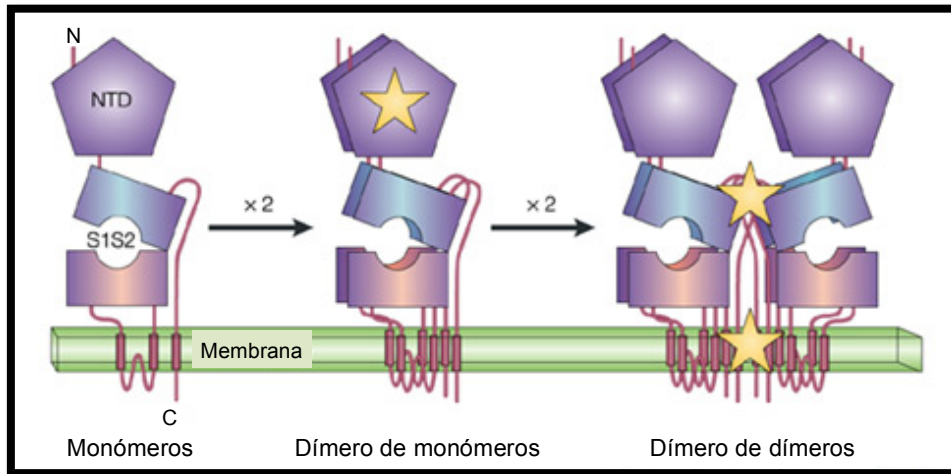


Figura 3. Estructura de los iGluRs. Todos los iGluRs comparten la misma estructura básica. El monómero posee: un dominio amino terminal (NTD; estrella en medio de la figura); dos regiones S1 y S2; tres segmentos transmembranales (M1, M3 y M4) y uno reentrante (M2); así como un dominio carboxilo terminal (C). Modificado de Madden, 2002.

Los iGluRs son canales iónicos permeables a cationes, aunque la permeabilidad relativa a Na^+ o Ca^{+2} depende de la familia y de las subunidades que componen el receptor. La unidad funcional de los receptores ionotrópicos está formada por un complejo de 4 subunidades que se ordenan alrededor de un poro permeable a cationes. Todas las subunidades presentan una estructura común formada por 4 dominios transmembrana, un dominio amino-terminal largo y un dominio carboxilo corto (Figura 3).

Los iGluRs se clasifican en función de su ligando específico en: receptores sensibles a N-metil-D-aspartato (NMDA), receptores sensibles al ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y receptores sensibles a kainato (KA) (Yi y Hazell, 2006). La localización subcelular de los receptores tanto NMDA como AMPA es postsináptica, mientras que los receptores de kainato se localizan tanto a nivel postsináptico como presináptico. Dentro de las diferencias existentes entre este tipo de receptores se encuentra que los receptores AMPA activan canales iónicos permeables a Na^+ y K^+ y en algunos casos a Ca^{+2} , e intervienen principalmente en la transmisión glutamatérgica rápida. Los receptores NMDA activan canales permeables tanto a Na^+ y

K^+ como a Ca^{+2} , y parecen estar implicados en los procesos de plasticidad neuronal. Sin embargo, el papel que desarrollan los receptores de KA no es muy conocido, aunque se piensa que pueden participar en la modulación de la transmisión GABAérgica (Tabla 1).

Tabla 1: Características y distribución de los iGluRs.

	Respuesta celular	Agonistas	Antagonistas	Localización
NMDA	↑ Permeabilidad Ca^{+2} , Na^+ , K^+	NMDA, glicina	D-AP5, CGS19755	Hipocampo, corteza y cerebelo (capa granular)
AMPA	↑ Permeabilidad Na^+ , K^+	AMPA	NBQX, GYKI52466	Similar al NMDA: cerebelo (capa molecular)
KA	↑ Permeabilidad Na^+ , K^+	Kainato, domoato	Kinurenato, AMOA	Complementario a los NMDA/AMPA: hipocampo, hipotálamo, corteza, médula espinal

Fuente: Dingleline y McBain, 1994; MacDonald et al., 1996; Cooper et al., 1996.

A diferencia de los iGluRs, los mGluRs constituyen un conjunto de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) que realizan sus funciones mediante la modulación de la producción de segundos mensajeros intracelulares y de la regulación de la fosforilación de proteínas, o bien a través de la modulación directa de canales de Ca^{+2} o K^+ (Schoepp et al., 1990, Conn y Pin, 1997; Figura 4).

Los mGluRs se clasifican en 3 grupos en función de la homología de la secuencia de aminoácidos, la farmacología y la vía de transducción de señales que activan. El grupo I estimula la actividad de la fosfolipasa C y la hidrólisis de fosfoinosítidos, promoviendo la formación de diacilglicerol e inositol trifosfato, con la siguiente activación de la proteína cinasa C (*Protein kinase C*, PKC) e incremento en la liberación de Ca^{+2} desde los compartimentos intracelulares, respectivamente (Schoepp et al., 1990). Este grupo está integrado por los receptores mGluR1 y mGluR5, que a su vez presentan variantes de procesamiento alternativo denominadas 1a, 1b, 1c y 1d (Pin et al., 1992; Mary et al., 1997), y 5a y 5b (Minakami et al., 1995). El grupo II está integrado por los receptores mGluR2 y mGluR3, mientras que el grupo III comprende los subtipos mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. Con excepción de mGluR6, todos los subtipos del grupo III presentan dos variantes de procesamiento alternativo

(mGluR4a y mGluR4b, mGluR7a y mGluR7b, mGluR8a y mGluR8b) (Thomsen et al., 1997; Flor et al., 1997; Corti et al., 1998). Tanto los receptores del grupo II como los receptores del grupo III están acoplados negativamente a la adenilato ciclasa y, por lo tanto, a la reducción de los niveles de AMPc (Conn y Pin, 1997).

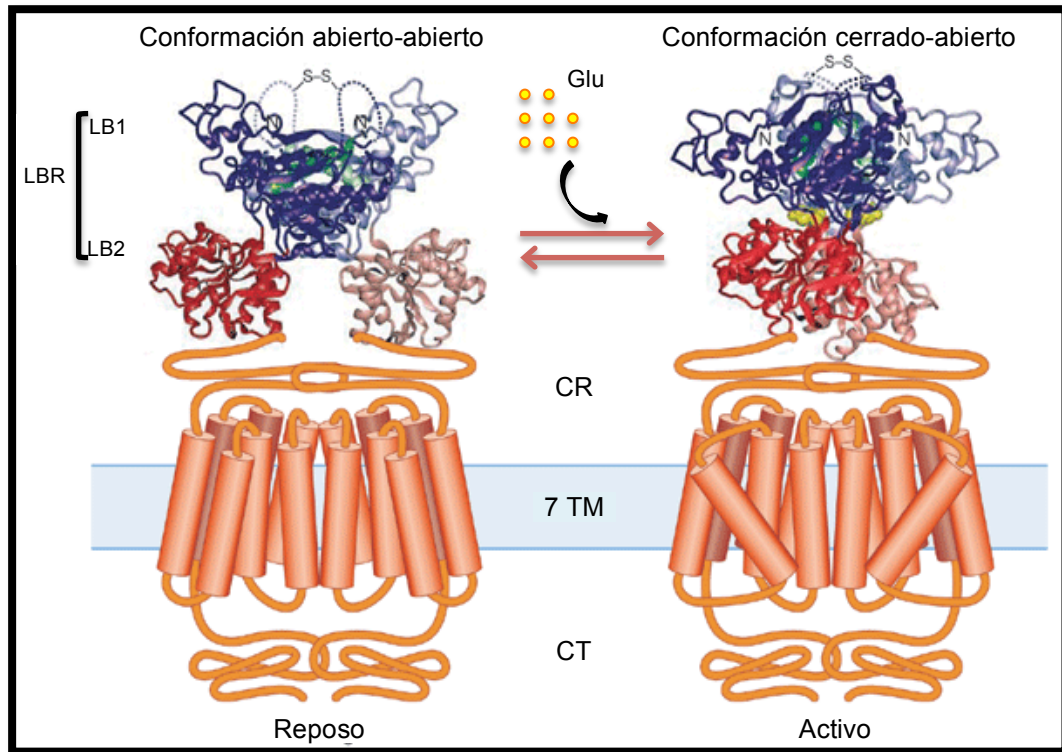


Figura 4. Estructura de los mGluRs. Estos receptores existen como homodímeros. Son caracterizados por un dominio extracelular largo, el cual se encuentra dividido en una región de unión a ligando (LBR) que a su vez se subdivide en LB1 y LB2; y una región rica en cisteínas (CR). Además posee 7 dominios transmembranales (TM1-TM7). Modificado de Moepps y Fagni, 2003.

2.2.2 Estructura y función de los transportadores de glutamato

La terminación de la transmisión glutamatérgica se realiza por la remoción del Glu del espacio sináptico, dicho proceso es realizado principalmente por proteínas integrales de membrana denominadas transportadores de Glu. Hasta la fecha se han sido caracterizados cinco subtipos de transportadores de Glu, denominados transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT1-EAAT5). Estos transportadores presentan patrones de distribución y propiedades cinéticas diferentes en las distintas regiones del cerebro. Los transportadores EAAT1 y EAAT2, conocidos como GLAST y

GLT-1, respectivamente, se expresan casi de forma exclusiva en las células gliales (Robinson, 2006). GLAST está expresado abundantemente en el cerebelo, mientras que GLT-1 está presente sobre todo en el cerebro anterior. Los transportadores EAAT3 y EAAT4 son de expresión neuronal. Particularmente, EAAT4 se expresa en las células de Purkinje en el cerebelo, mientras que EAAT3 es abundante en neuronas corticales. Por otra parte, la expresión de EAAT5 es casi exclusiva de la retina (Danbolt, 2001; Robinson, 2006).

De manera general, los transportadores glutamatérgicos comparten varias características, como su peso molecular, en el rango de 65 a 77 KDa y que varía de acuerdo con el grado de glicosilación; aunque presentan una homología del 50% en su estructura, sus propiedades y su regulación son diferentes. En las BGC, la captura de Glu es efectuada por el transportador GLAST (Ruiz y Ortega, 1995; Anderson y Swanson, 2000).

Los transportadores de Glu poseen un sitio de unión para el aminoácido sustrato y otro para unión de cationes, el dominio C y N terminal están hacia el citoplasma creando una estructura de barril formado por ocho dominios transmembranales (TMDs), los TMD1-6 constituyen el N-terminal y los TMD6-8 el C-terminal (Grewer et al., 2008). La actividad de los transportadores depende del gradiente electroquímico generado por la ATPasa Na^+/K^+ (Camacho y Massieu, 2006). Una molécula de Glu es transportada al citoplasma junto con dos iones Na^+ , mientras que un ión K^+ es liberado al espacio extracelular. La recuperación del gradiente electroquímico de Na^+ después de la entrada de Glu lo realiza la ATPasa a expensas del consumo de ATP (Camacho y Massieu, 2006).

Como se mencionó anteriormente, el Glu es el principal neurotransmisor excitador en el SNC; sin embargo, existe evidencia que sugiere que este neurotransmisor está implicado en la señalización fótica transmitida desde la retina al NSQ del hipotálamo, el reloj maestro en vertebrados (Castel et al., 1993); el cual, regula de manera muy específica a un determinado grupo de ritmos biológicos, los ritmos circadianos.

2.3 Ritmos biológicos

Cuando amanece, las funciones de nuestro organismo se aceleran, anticipándose al aumento de actividad física que se aproxima. Las fases del ciclo sueño-vigilia en el humano adulto, la secreción hormonal, la ingesta de alimento, la temperatura corporal, por mencionar algunos ejemplos, siguen un ritmo biológico de aproximadamente 24 horas, es decir, un ritmo circadiano (Cassone et al., 1993; Richter et al., 2004; Ohdo, 2007).

Dentro del organismo, cada célula, tejido u órgano tiene su propia ritmicidad (Yamazaki et al., 2000). Estos ritmos están bien coordinados para el buen funcionamiento del organismo. Existe una jerarquía entre los distintos ritmos, y el encargado de coordinarlos es el NSQ del hipotálamo. Las múltiples actividades biológicas de los seres vivos, incluidas las del humano, no se manifiestan de manera aleatoria. Por el contrario, varían de forma periódica, regular y predecible. Se admite que la ritmicidad es una propiedad fundamental de todos los organismos, desde los unicelulares hasta los pluricelulares más complejos, y en estos últimos, a todos los niveles de organización: desde el subcelular hasta el sistema orgánico en su totalidad (Miró y Buela-Casal, 1994).

Los ritmos biológicos constituyen una característica endógena de distintas especies, con distinta duración en su oscilación. Estos ritmos biológicos están determinados por los «relojes biológicos» internos (*pacemakers*) que son capaces de dirigir una ritmicidad, incluso en ausencia de las distintas señales exógenas cíclicas, como la luz, el alimento y la temperatura a los que todos los organismos están expuestos; sin embargo, estas señales cíclicas tienen una influencia notable sobre dichas ritmicidades endógenas para sincronizar los ritmos circadianos endógenos con el tiempo ambiental (Krieger, 1974). Algunos autores han estudiado la incidencia de determinados factores que son capaces de modificar la periodicidad de algunos ritmos biológicos. Estos factores que ayudan a «poner en hora» nuestros relojes biológicos endógenos respecto al contexto ambiental en el que nos movemos fueron denominados sincronizadores «*synchronizer*» por Halberg (Knauth y Rutenfranz, 1976), «*zeitgeber*»

(del alemán “indicador de tiempo”) por Aschoff (Griffiths, 1986; Menna-Barreto, 1999) o «*entraining agent*» por Pittendrigh (Follett y Sharp, 1969).

2.3.1 Parámetros que definen un ritmo biológico

Los ritmos biológicos forman parte de la adaptación de los seres vivos al entorno siendo fundamentales para la supervivencia de las especies, y son definidos como la recurrencia de cualquier fenómeno en un sistema biológico a intervalos regulares de tiempo (Mora y Sanguinetti, 2004).

Los ritmos presentan características muy heterogéneas: por la duración en su oscilación, por los valores medios en torno a los que se produce dicha oscilación, por su frecuencia, etc. Los parámetros que nos permiten definir cada uno de estos ritmos son los que a continuación se mencionan (Peleg et al., 1995; Portela et al., 1996; Bourdon y Buquet, 2004; Figura 5):

- a. **MESOR o valor medio.** Es la media aritmética de todos los valores obtenidos dentro de un ciclo. Es el valor alrededor del que oscila la variable. El nombre fue introducido por Halberg y colaboradores (1977), siendo el significado de estas siglas «*Midline Estimating Statistic of Rhythm*».
- b. **Amplitud.** Es la diferencia entre el valor máximo (o mínimo) y el valor medio de una oscilación. La amplitud es el valor que nos aporta la información sobre la cuantía de la oscilación del ritmo.
- c. **Fase.** Es la distancia que hay desde un tiempo de referencia dado (como puede ser la medianoche o el despertar), hasta el momento en que se produce el valor máximo de un ritmo.
- d. **Periodo.** Es el intervalo de tiempo entre dos puntos iguales de ritmo, es decir, el tiempo necesario para que transcurra un ciclo completo.
- e. **Frecuencia.** Es el número de eventos que se presentan en una determinada unidad de tiempo.

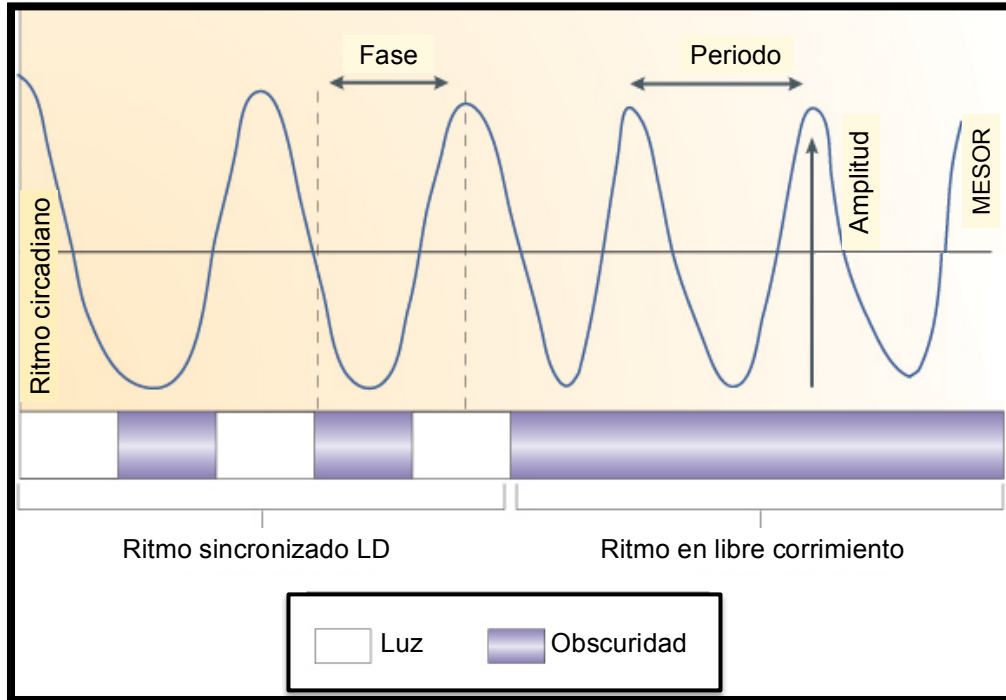


Figura 5. Principales parámetros que definen un ritmo biológico. Los parámetros de la función cosinoidal (ajuste cosinor por mínimos cuadrados) son empleados para describir las características de cada ritmo biológico concreto, ejemplo de estos parámetros son: el periodo (tiempo comprendido entre dos valores análogos de la variable ajustada), el MESOR (valor medio de la variable estimada sobre la curva ajustada), la amplitud (diferencia entre el valor máximo de la variable ajustada y el MESOR) y la fase (punto temporal determinado, dentro de una variable rítmica biológica). Modificado de Pedersen et al., 2005.

2.3.2 Clasificación de los ritmos biológicos

Los ritmos biológicos se clasifican en tres grupos de acuerdo con la frecuencia de su oscilación (Menna-Barreto, 1999; Bourdon y Buquet, 2004; Hernández et al., 2004; Salgado et al., 2009):

- a. **Ritmos circadianos:** aquellos que tienen una frecuencia próxima a un día, es decir, entre 20-28 h; por ejemplo los ciclos de luz, de temperatura y la secreción del cortisol, melatonina o prolactina.
- b. **Ritmos infradianos:** cuando su frecuencia es inferior a un día, es decir, con un periodo mayor a 28 h; por ejemplo el ciclo lunar y los ciclos reproductivos.

- c. **Ritmos ultradianos:** son aquellos que tienen una frecuencia superior a un día, es decir, un periodo inferior a 20 h, por lo que ocurren varias veces al día; por ejemplo los ritmos respiratorios, cardíacos o las ondas cerebrales.

2.3.3 Propiedades fundamentales de los ritmos circadianos

Carácter endógeno

El origen endógeno de la ritmicidad biológica se basa en que ante la ausencia del sincronizador, el ritmo persiste con una ligera variación de periodo. Lo anterior indica que el ritmo observado no depende de fenómenos geofísicos cíclicos, sino que el ritmo se mantiene en condiciones constantes, lo cual refleja un proceso interno del organismo. Esta capacidad esencial de los organismos para mantener la ritmicidad circadiana, aun en ausencia de señales ambientales periódicas, es conocida como ritmo en oscilación espontánea o en corrimiento libre (*free running*) (Roenneberg y Merrow, 2003). Sin embargo, los organismos no se encuentran aislados de señales temporales, sino que mantienen una estrecha relación temporal con las señales ambientales. Por lo anterior, la fase y el periodo del ritmo transmitidos pueden ajustarse a la fase y al periodo de los cambios cíclicos ambientales: proceso llamado *sincronización* (Aschoff, 1960).

Capacidad de sincronización

La señal ambiental más predecible y consistente es el ciclo de 24 h de luz/oscuridad, ya que casi todos los ritmos circadianos endógenos pueden ser sincronizados por este ciclo. Sin embargo, existen otras señales ambientales que pueden sincronizar al reloj biológico como: el alimento, el ejercicio o las interacciones sociales (Pittendrigh y Daan, 1976). Las señales proporcionadas por los sincronizadores ambientales, al ser captadas por los transductores de los organismos, ajustan los marcapasos endógenos adelantando o retrasando sus fases, hasta que los estabilizan con el tiempo ambiental (Albers et al., 1992).

Origen multioscillatorio

El oscilador circadiano central en los vertebrados es el NSQ localizado en la base anterior del hipotálamo y consiste de dos pequeños grupos de neuronas en la parte ventral del hipotálamo (Reppert y Weaver, 2001; Yan, 2009). Este núcleo controla los ritmos circadianos de secreción de las hormonas adrenocorticotropa (*Adrenocorticotropic hormone*, ACTH) y prolactina, del ciclo sueño-vigilia (Ohdo, 2007), la temperatura corporal, la frecuencia cardíaca, la actividad renal, el metabolismo hepático, entre otros (Cassone et al., 1993; Richter et al., 2004). Además del oscilador central, se han descrito una serie de osciladores en otras áreas del cerebro (Abe et al., 2002), en la retina (Tosini y Menaker, 1996), y en tejidos periféricos (Balsalobre et al., 1998; Yamazaki et al., 2000; Damiola et al., 2000; Lamia et al., 2008). Aun cuando no se conoce con exactitud la manera en la que funcionan los osciladores periféricos, es claro que el NSQ es el responsable de coordinar a los demás osciladores de tal manera que se orqueste una ritmicidad óptima para los organismos (Yamazaki et al., 2000).

2.3.4 Fisiología de los ritmos circadianos

El sistema circadiano es el conjunto de estructuras cerebrales que organiza los ritmos de determinados procesos fisiológicos. Este sistema consta de: a) el NSQ, que genera ritmicidad autónoma, b) las vías aferentes al NSQ, que conducen la información de señales externas al organismo u otras zonas del sistema nervioso al NSQ, y c) las vías eferentes al NSQ, que acoplan al NSQ con los sistemas efectores que producen los ritmos (Cermakian y Sassone-Corsi, 2000).

NSQ

En mamíferos, el NSQ es el principal reloj circadiano ubicado en la porción ventral del hipotálamo anterior, ventrolateral al receso óptico del tercer ventrículo y dorsal al quiasma óptico (Reppert, 2000). La lesión de este núcleo produce la pérdida de los ritmos circadianos (Poletini et al., 2007), comportamiento y funciones fisiológicas como actividad motora, ciclo sueño/vigilia, temperatura y secreción hormonal, en varias especies de mamíferos, incluido el hombre (Richter et al., 2004). Los animales con lesión del NSQ pierden la ritmicidad y el trasplante de tejido fetal hipotalámico que

contiene el NSQ restaura la ritmicidad circadiana con el periodo del donador (Ralph et al., 1990; Borgs et al., 2009).

El NSQ tiene forma ovoide y tradicionalmente se ha dividido en dos zonas y desde el punto de vista anatómico: una región ventrolateral (*core*) y una región dorsomedial (*shell*) (Hamada et al., 2001; Moore et al., 2002). La región ventrolateral se localiza sobre el quiasma óptico y es retino-receptiva, es decir, recibe la información luminosa proveniente de las células ganglionares tipo W de la retina a través del tracto retino hipotalámico (TRH). En cambio, la zona dorsomedial se ha asociado principalmente a funciones integrativas, entre ellas la generación y transmisión del ritmo hacia el resto del cerebro (Ángeles-Castellanos et al., 2007).

Vías aferentes

Las vías aferentes al NSQ consisten en el TRH (vía directa de información de los niveles ambientales de luz) (Moore y Lenn, 1972), el tracto genículohipotalámico (vía indirecta de información de los niveles ambientales de luz) (Card y Moore, 1989), vías procedentes de los núcleos de rafé (transmiten estímulos no fóticos al NSQ) (Meyer-Bernstein y Morin, 1996) y de las neuronas tuberomamilares de la hipófisis posterior. Los neurotransmisores involucrados en los diferentes sistemas aferentes del oscilador central son el Glu en el TRH (Moore y Lenn, 1972); el neuropéptido Y (Glass et al., 2010) y GABA en el tracto genículo-hipotalámico (Van den Pol, 1993), y la serotonina en las proyecciones de los núcleos de rafé (Meyer-Bernstein y Morin, 1996).

Vías eferentes

Las vías eferentes se pueden clasificar según la zona del SNC a la que se proyectan. Entre las vías eferentes que se dirigen al hipotálamo destacan las eferentes al núcleo paraventricular (NPV), presumiblemente involucrado en el control de los ritmos de funciones hormonales y autonómicos (De Gortari y Joseph-Bravo, 2009), las eferentes al área preóptica, involucradas en la regulación de la temperatura (Westerman et al., 2010), balance de fluidos y la conducta sexual (Graham y Pfaus, 2010), y finalmente las eferentes al área retroquiasmática, desde la cual se envían señales a los hemisferios cerebrales (regulación de la conducta), tronco encefálico (regulación autonómica) y a la médula espinal (control sensorial y motor). Por otro lado,

las vías eferentes que proyectan del hipotálamo incluyen las que se proyectan al tálamo (locomoción), sistema límbico (memoria y tono afectivo) y al núcleo geniculado lateral (Johnson et al., 1988). Este sistema utiliza una serie de neurotransmisores, siendo el GABA el más abundante en el NSQ y en las vías eferentes (Choi et al., 2008). El NSQ también sintetiza neuropéptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Loh et al., 2011), la arginina-vasopresina (Franci et al., 2010) y la somatostatina (Ibata et al., 1999).

Todas estas conexiones aferentes y eferentes al NSQ, le permiten a este núcleo recibir, procesar y enviar información hacia el resto del organismo para coordinar de manera precisa a los demás osciladores; para ello, es necesario que exista una regulación fina de los componentes que originan los ritmos circadianos, de tal manera que se genere la ritmicidad adecuada para los organismos.

2.3.5 Regulación molecular de los ritmos circadianos

Durante los últimos años, los avances más notorios en el estudio de los mecanismos generadores de la ritmicidad circadiana se han logrado en la caracterización de genes relacionados con esta función, los cuales han sido denominados “genes reloj”. Gran parte del trabajo se ha realizado en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), pero el modelo ahí iniciado se ha ampliado a otras especies biológicas, incluyendo al humano.

El primero de los genes caracterizados en la regulación de la ritmicidad es el conocido como *Per* (Period) y fue descubierto en *D. melanogaster* en 1971 (Konopka y Benzer, 1971; Kohsaka y Bass, 2006). Sin embargo, el primer gen descrito en el mamífero fue *Clock* (*circadian locomotor output cycles kaput*). Hasta la fecha se han identificado en mamíferos los siguientes genes reloj homólogos a los de *Drosophila*: *Clock*, *Bmal1* [*brain and muscle aryl hidrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-like protein 1*], *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* (*Cryptochrome 1*), *Cry2*, *Rev-erba*, *Rev-erbb*, *ckle* (*casein kinase 1ε*) y *RORα* (*retinoic acid receptor-Related Orphan Receptor α*) (Toh, 2008; Borgs et al., 2009).

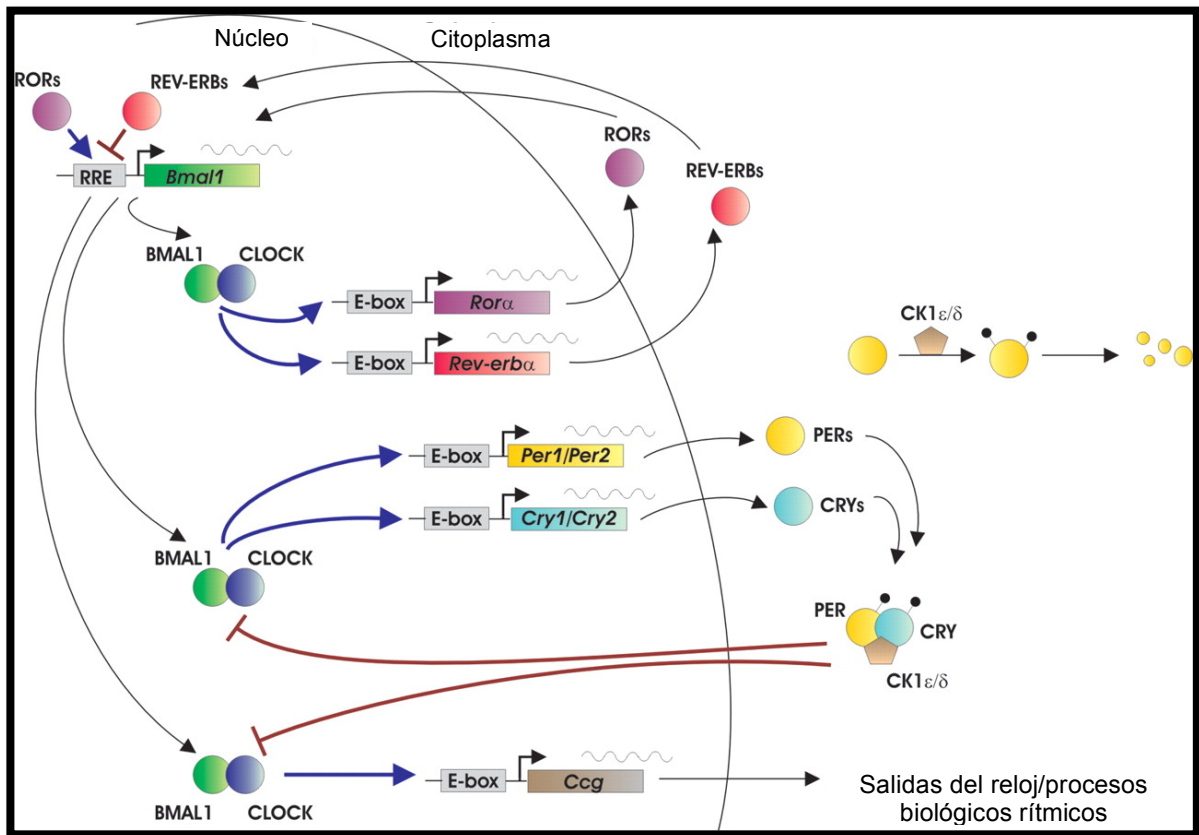


Figura 6. Modelo del reloj molecular en mamíferos. CLOCK y BMAL1 dimerizan en el citoplasma y translocan en el núcleo. El heterodímero CLOCK-BMAL1 se une a secuencias reguladoras (*E-box*) ubicadas en la región promotora de los genes *Per* y *Cry*, activando su transcripción. PER y CRY se someten a translocación nucleocitoplásmica, donde forman heterodímeros y luego regresan al núcleo para inhibir a CLOCK-BMAL1, dando lugar a una disminución de la transcripción de los genes *Per* y *Cry*. CLOCK-BMAL1 también inducen la transcripción de *Rev-erbα*, que a su vez inhibe la transcripción de *Bmal1* a través de la unión de RORE dentro del promotor *Bmal1*. El asa de autorregulación transcripción-traducción que comprende CLOCK-BMAL1 y PER-CRY constituye el núcleo del reloj y genera ritmos de 24 h de transcripción de genes. Modificado de Ko y Takahashi, 2006.

El mecanismo molecular que genera los ritmos circadianos en los mamíferos involucra la interacción de asas de retroalimentación positivas y negativas de procesos transcripcionales y traduccionales de los productos de los genes reloj (Dunlap 1999; Harmer et al., 2001; Reppert y Weaver, 2001). Las proteínas CLOCK y BMAL1 activan la transcripción rítmica de los genes *Cry* y *Per* 1-3; la información codificada por esos dos genes es transcrita en el ARN mensajero (ARNm) que sale del núcleo y aumenta la traducción de las proteínas PER y CRY (Dunlap 1999; Reppert y Weaver, 2001). Si la

concentración de estas proteínas es lo suficientemente grande, éstas dimerizan e inhiben la transcripción de los genes *Per1* y *Per2* al interactuar con CLOCK y BMAL1. El asa de retroalimentación positiva es mediada por PER2, que regula la transcripción de *Bmal1*; BMAL1 promueve luego la heterodimerización de CLOCK:BMAL1 de modo que los ciclos de transcripción de *Per/Cry* puedan ser reiniciados (Dunlap 1999; Harmer et al., 2001; Reppert y Weaver, 2001; Okamura et al., 2002; Figura 6). Cabe mencionar que este equilibrio del mecanismo molecular de regulación circadiana no sólo está presente en las neuronas del NSQ, sino en todas las células del organismo (Yamazaki et al., 2000). Además, estas asas de retroalimentación vienen acompañadas de otras asas complementarias. Una de las asas mejor caracterizadas es la mediada por los receptores nucleares huérfanos ROR α y Rev-Erb α , quienes son los encargados de activar e inhibir respectivamente la actividad de *Bmal1* haciendo que éste oscile de manera circadiana (Preitner et al., 2002).

Los genes reloj regulan la transcripción de otros genes, denominados genes controlados por el reloj (*Clock Controlled Genes*, CCG), siendo ésta una manera por la cual se regulan las diferentes funciones que presentan ritmicidad en el organismo. Entre los genes que se encuentran bajo regulación circadiana se incluyen enzimas metabólicas, canales iónicos y péptidos, como arginina-vasopresina (AVP) (Jin et al., 1999), proteína de unión al elemento D (DBP) (Le Martelot et al., 2009).

2.3.6 Relojes periféricos o esclavos

Las oscilaciones circadianas en la expresión de genes del reloj no ocurren solamente en el NSQ, sino también en una variedad de tejidos periféricos, incluyendo el hígado, el corazón, el páncreas, el músculo esquelético, los riñones y los pulmones (Balsalobre et al., 1998; Yamazaki et al., 2000; Stokkan et al., 2001; Balsalobre, 2002; Schibler et al., 2003; Mendoza, 2007; Lamia et al., 2008). Otros tejidos, incluyendo la retina (Tosini y Menaker, 1996), el bulbo olfatorio (Granados-Fuentes et al., 2004) y los fibroblastos en cultivo (Izumo et al., 2003; Dibner et al., 2009) exhiben también expresión circadiana de genes del reloj. Muchos de estos ritmos pueden ser sincronizados por el ciclo de luz y son compensados por la temperatura, lo que sugiere que dichos tejidos pueden actuar también como osciladores circadianos (Izumo et al.,

2003; Tsuchiya et al., 2003). Interesantemente, la corteza cerebelar pertenece a una de las regiones cerebrales en la que los ritmos de los genes reloj han sido descritos (Akiyama et al., 1999; Namihira et al., 1999; Farnell et al., 2008), lo que sugiere que el cerebelo contiene un oscilador circadiano.

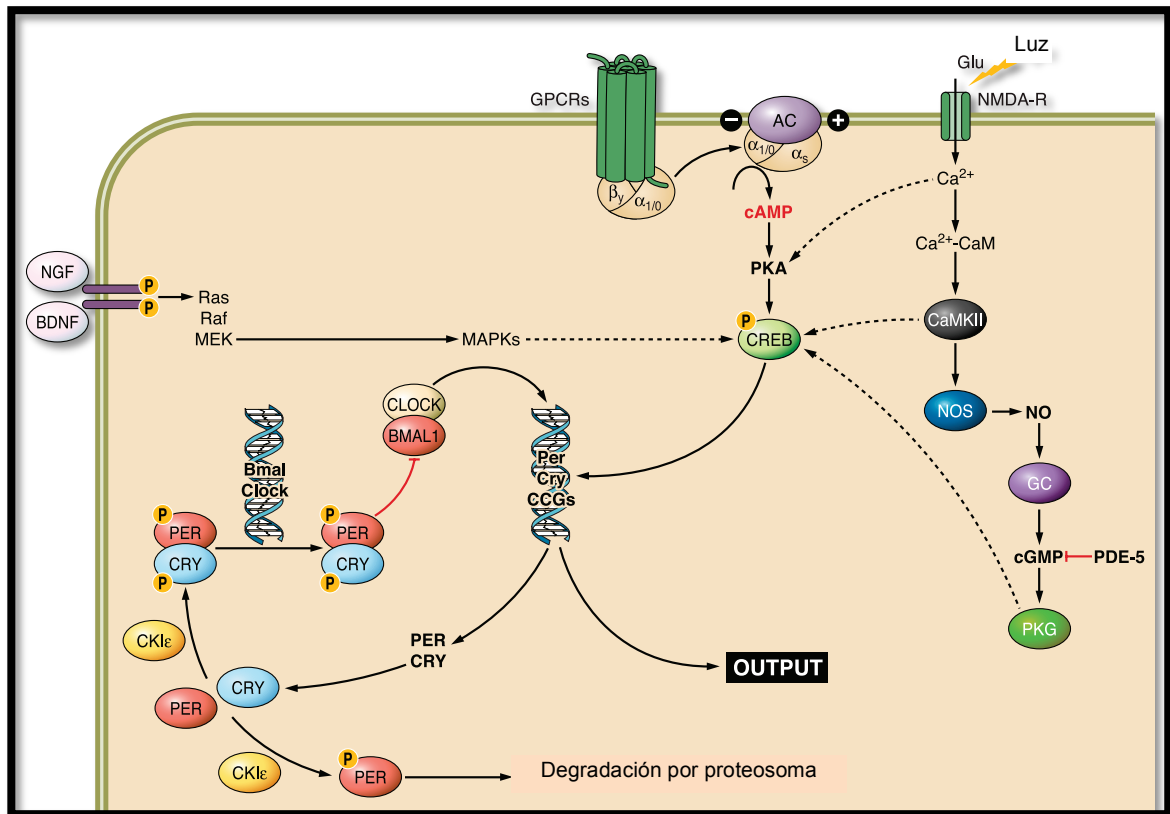


Figura 7. Esquema general de los mecanismos de transducción de señales implicados en la sincronización circadiana. El Glu activa la entrada de calcio inducida por los receptores NMDA que, junto con otros segundos mensajeros, desencadena la activación de diferentes cascadas de transducción de señales, incluyendo la calmodulina cinasa II (CaMKII) y la actividad de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), la proteína cinasa dependiente de AMPc y GMPc, y la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK). A pesar de que la interferencia entre estas cascadas no es bien conocida, es posible que un mecanismo común implicado en la ruta sea la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB). A su vez, pCREB activa la transcripción de *per1-2* mediante la unión a un elemento de CRE en sus regiones promotoras, estos genes también son activados por la unión de *Clock/Bmal* a las cajas E. Las líneas sólidas representan los mecanismos que han sido descritos experimentalmente, y las líneas punteadas indican posibles enlaces adicionales de la vía. Modificado de Golombek y Rosenstein, 2010.

Por otro lado, existen reportes que demuestran que diversas señales, como la administración de análogos de los glucocorticoides y el cambio en el horario de alimentación, alteran los patrones circadianos de expresión de los genes reloj en tejidos periféricos, pero no afectan su expresión en el NSQ (Damiola et al., 2000; Feillet et al., 2006; Koyanagi et al., 2006; Challet, 2007; Mendoza, 2007; Segall y Amir, 2010). Esto sugiere que bajo ciertas condiciones metabólicas o fisiológicas, el control local del ritmo de los osciladores periféricos se puede desacoplar del control del NSQ, para adaptarse a condiciones particulares sin afectar al reloj central. Esto a su vez permitiría optimizar la fisiología celular, de tal forma que se restrinja la expresión de ciertos genes cuando sus productos no son requeridos. Cuando estas condiciones particulares desaparecen, el NSQ puede sincronizar a los osciladores periféricos a su ritmo normal (Damiola et al., 2000; Stokkan et al., 2001).

Como fue mencionado anteriormente, las señales luminosas son transmitidas desde la retina al NSQ a través del TRH. Sin embargo, existe evidencia que demuestra que el neurotransmisor de dicha vía es el aminoácido excitador Glu, el cual estimula a las neuronas del NSQ en presencia de luz (Rusak y Bina, 1990; Figura 7). De manera más que interesante, se ha observado que la concentración extracelular de Glu en los alrededores del NSQ presenta una variación circadiana (Honma et al., 1996). Además, en 1994, Ding y colaboradores reportaron que la administración de agonistas glutamatérgicos mimetizan la curva de fase-respuesta producida por los pulsos de luz, mientras que la administración de antagonistas NMDA anula este efecto del Glu sobre el NSQ (Ding et al., 1994).

2.4 Conformación y modificaciones post-traduccionales de BMAL1

BMAL1 es una proteína que posee un dominio básico hélice-asa-hélice y dos dominios PAS (PAS A y PAS B), los cuales son necesarios para su unión con el ADN y para la formación de heterodímeros, respectivamente. Además de los dominios ya mencionados, BMAL1 contiene otros dominios, entre ellos los dominios de señal de exporte nuclear (*nuclear export signal*, NES) y los dominios de señal de localización nuclear (*nuclear localization signal*; NLS) altamente conservados (Figura 8).

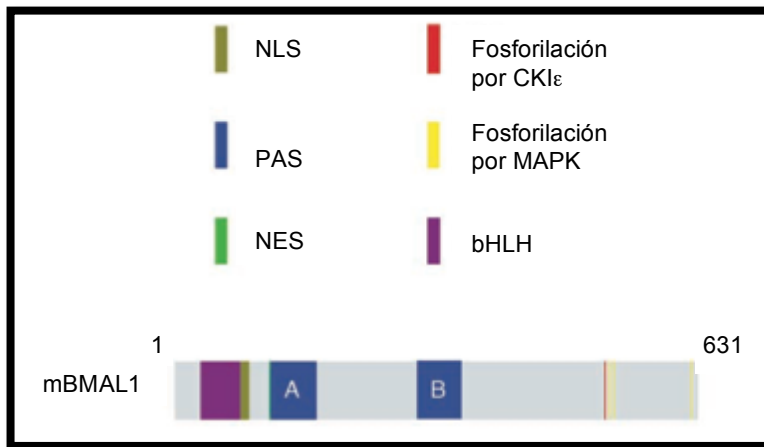


Figura 8. Representación esquemática de los dominios funcionales presentes en la proteína BMAL1 de *Mus musculus*. Abreviaturas: bHLH, dominio básico hélice-asa-hélice; NES, señal de exporte nuclear; NLS, señal de localización nuclear; PAS, PER-ARNT-SIM. Modificado de Hirayama y Sassone-Corsi, 2005.

La proteína BMAL1 es un componente crucial de la maquinaria molecular que regulan los ritmos circadianos. Como sabemos, existe una regulación fina del asa de transcripción y traducción que constituye el núcleo de la maquinaria circadiana; sin embargo, cabe mencionar la existencia de un gran número de procesos de regulación que controlan los componentes del reloj circadiano tanto a nivel post-transcripcional (Cermakian y Sassone-Corsi, 2000), como a nivel de estabilidad de la proteína (Sahar et al., 2010); esto mediante la localización intracelular (Vielhaber et al., 2001).

Las modificaciones post-traduccionales de las proteínas reloj garantizan la persistencia de los ritmos circadianos, debido a la regulación y el recambio de los principales componentes del reloj (Gallego y Virshup, 2007; Figura 9); ejemplo de estas modificaciones son la fosforilación, la acetilación, la ubiquitinación, la sumoilación, entre otras. En el siguiente apartado se mencionan las modificaciones post-traduccionales de BMAL1 y las consecuencias de dichas modificaciones.

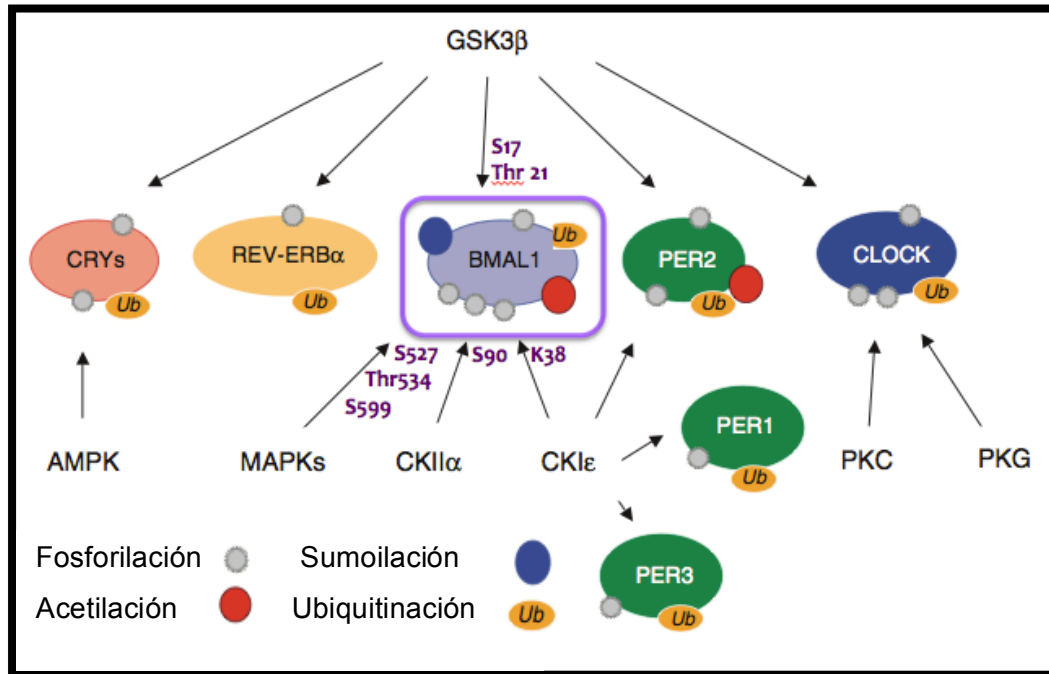


Figura 9. Las proteínas reloj son blanco de una gran variedad de modificaciones post-traduccionales. La fosforilación es común y provocada por una serie de cinasas activadas por diferentes vías de señalización (Hirayama y Sassone-Corsi, 2005). Otras modificaciones post-traduccionales incluyen la acetilación de BMAL1, una modificación crucial para la ritmicidad circadiana (Hirayama et al., 2007). La ubiquitinación y sumoilación también han sido descritas por una serie de reguladores del reloj (Cardone et al., 2005; Kwon et al., 2006; Lee et al., 2008; Sahar et al., 2010).

2.4.1 Fosforilación de BMAL1

La fosforilación de las proteínas reloj tiene un papel importante en el sistema circadiano de diferentes organismos. Muchas proteínas reloj contienen sitios fosfoaceptores putativos para un número de posibles cinasas (Hirayama y Sassone-Corsi, 2005). En relación a la proteína BMAL1, se sabe que exhibe un perfil de fosforilación circadiana en varios tejidos y en fibroblastos sincronizados con suero; su forma fosforilada es en su mayoría nuclear (Kondratov et al., 2003). La proteína BMAL1 puede ser fosforilada por varias cinasas, entre ellas: la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y caseína cinasa I (CKI) (Eide et al., 2002; Sanada et al., 2002). MAPK fosforila a BMAL1 en tres residuos: Ser-527, Thr-534 y Ser-599, los cuales están muy conservados en las proteínas BMAL1 de vertebrados (Sanada et al., 2002); mientras que los sitios para fosforilación de BMAL1 por la cinasa CKI aún no han sido

identificados. Sin embargo, es sabido que hay un motivo consenso bien conservado en el dominio C-terminal de las proteínas BMAL1 en vertebrados en la cual CKI realiza la fosforilación. Curiosamente, este supuesto motivo de fosforilación por CKI se solapa en parte con el motivo consenso de MAPK, sugiriendo que estas dos cinasas pueden estar compitiendo para regular la función de BMAL1 (Hirayama y Sassone-Corsi, 2005). BMAL1 también es blanco de otras cinasas, como la cinasa glucógeno síntasa 3β (GSK3 β) y la caseína cinasa 2α (CK2 α). Recientemente, fue demostrado que GSK3 β fosforila a BMAL1 de mamíferos y controla su estabilidad y actividad (Sahar et al., 2010). Un sitio importante para la actividad de CK2 α en la proteína BMAL1 es el residuo de serina en la posición 90 (S90), ya que ha sido demostrado que la mutación en esta posición elimina la ritmicidad circadiana (Tamaru et al., 2009).

2.4.2 Sumoilación, acetilación y ubiquitinación de BMAL1

Entre las proteínas reloj, ha sido demostrado que BMAL1 presenta varias modificaciones post-traduccionales además de la fosforilación, entre ellas la sumoilación, la cual corresponde a la adición de la proteína SUMO a proteínas diana para la reparación del ADN, transcripción, degradación de proteínas, entre otras funciones (Cardone et al., 2005); la ubiquitinación, correspondiente a la adición de la proteína ubiquitina a proteínas diana, principalmente para la degradación de proteínas mediante el proteosoma (Kwon et al., 2006; Lee et al., 2008); y la acetilación, referente a la adición de un grupo acetilo [$-\text{COCH}_3$] en una molécula determinada para funciones relacionadas con la síntesis biológica y la degradación de moléculas orgánicas. Los grupos [$-\text{COCH}_3$] también son agregados a las histonas y otras proteínas, modificando sus propiedades (Hirayama et al., 2007).

La sumoilación y la ubiquitinación son modificaciones post-traduccionales que influyen directamente en las vías intracelulares que controlan la estabilidad de la proteína. Sin embargo, la sumoilación en particular está involucrada en varios procesos celulares, como regulación transcripcional, transporte nuclear y estabilidad de la proteína. BMAL1 es sumoilado por un pequeño modificador parecido a la ubiquitina 1 (SUMO-1) en un residuo específico, lisina en la posición 259 (K259) localizado en el dominio de unión PAS. En relación a la ubiquitinación de BMAL1 se encontró que está

fuertemente ligado con la transactivación del heterodímero CLOCK-BMAL1, así como su proteólisis (Kwon et al., 2006).

Trabajos recientes han mostrado que la transcripción circadiana de los genes blanco del heterodímero CLOCK-BMAL1 es acompañado por cambios circadianos en la acetilación de residuos de lisina en las histonas 3 y 4 (H3 y H4), y el remodelaje de la cromatina (Etchegaray et al., 2003). Interesantemente, ha sido reportado que la proteína CLOCK posee actividad intrínseca de histona acetil transferasa (*histone acetyl transferase*, HAT) (Doi et al., 2006). Similar a otras HAT (Glozak et al., 2005), CLOCK también acetila otros sustratos además de las histonas, como la de su compañero de heterodimerización BMAL1, el cual es acetilado en un sólo sitio altamente conservado, el residuo de lisina en la posición 537 (K537) (Hirayama et al., 2007). Este evento es crucial para el programa transcripcional circadiano, debido a que la acetilación de BMAL1 aumenta la afinidad del heterodímero CLOCK-BMAL1 por el represor CRY, una asociación que es de suma importancia para el asa de retroalimentación negativa del reloj circadiano (Hirayama et al., 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

Existe evidencia que demuestra que la mayoría de las funciones fisiológicas de los organismos presentan una variación rítmica, y que además están coordinadas entre sí. Estas funciones fisiológicas son reguladas por circuitos específicos distribuidos en diferentes áreas del cerebro e integrados por distintos sistemas de neurotransmisores, siendo el Glu el neurotransmisor responsable de la activación de diferentes cascadas de transducción de señales implicados en la regulación de los ritmos circadianos (Golombek y Rosenstein, 2010).

Bmal1 es un gen reloj que conduce circuitos de retroalimentación de procesos de transcripción/traducción para sí mismo y otros genes, regulando el mecanismo molecular que genera los ritmos circadianos en los vertebrados. Sin embargo, la relevancia de este gen también se ve reflejada en la variedad de funciones que desempeña, ya que la sola ausencia de *Bmal1* genera alteración en la homeostasis de la glucosa, pérdida de los ritmos circadianos, problemas de fertilidad y embarazo, así como envejecimiento prematuro (Rudic et al., 2004; Kennaway, 2005; Kondratov et al., 2006). Recientemente, ha sido reportado que en el NSQ, BMAL1 es un regulador intracelular de la generación de los ritmos circadianos de Ca^{+2} (Ikeda e Ikeda, 2014), este ión juega un papel importante como segundo mensajero acoplando los eventos membranales producidos por las señales extracelulares con las cascadas bioquímicas citoplasmáticas y los programas génicos del núcleo.

El descubrimiento de los genes reloj ha permitido la identificación de áreas del cerebro que expresan la maquinaria molecular necesaria para la generación de los ritmos circadianos. En consecuencia, las oscilaciones diarias en la expresión génica de los genes reloj han sido identificadas en varias regiones del cerebro (Feillet et al., 2008), incluyendo la amígdala, el bulbo olfatorio, la habénula lateral y una variedad de núcleos en el hipotálamo (Guilding y Piggins, 2007); así como el cerebelo (Akiyama et al., 1999; Namihira et al., 1999). De particular interés, en el cerebelo, Namihira y colaboradores en 1999 reportaron patrones de expresión de los genes reloj *Clock* y *Bmal1*, los cuales se expresan diferencialmente. Asimismo, Akiyama y colaboradores (1999) demostraron que los genes *Per1* y *Per2* están expresados en la corteza

cerebelar. No obstante, el cerebelo ha sido propuesto como un oscilador esclavo, que puede ser desincronizado del NSQ por el alimento (Mendoza et al., 2010). Particularmente, las células de Purkinje desempeñan un papel importante en la generación de los ritmos circadianos del cerebelo, sin embargo se desconoce si las células gliales participan en la generación de estos ritmos. En el presente trabajo doctoral, el objetivo del estudio fue investigar la función del Glu en los mecanismos moleculares implicados en los procesos de transcripción/traducción de la proteína reloj BMAL1 en un modelo de cultivos primarios de BGC.

4. HIPÓTESIS

El Glu es el principal neurotransmisor excitador en los ritmos circadianos y es responsable de la activación de diferentes cascadas de transducción de señales implicadas en la regulación transcripcional/traducciona de la proteína reloj BMAL1.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar la función del Glu en los mecanismos moleculares implicados en los procesos de transcripción/traducción de la proteína reloj BMAL1 en un modelo de cultivos primarios de BGC.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar la expresión de BMAL1 mediante inmunodetección en fase sólida en cultivos de BGC.
2. Caracterizar la dependencia del tiempo y la dosis de Glu en la regulación de BMAL1 por inmunodetección en fase sólida en cultivos primarios de BGC.
3. Estudiar la(s) cascada(s) de señalización activada(s) por el Glu que regula los niveles de BMAL1 mediante inmunodetección en fase sólida en cultivos primarios de BGC.
4. Analizar la estabilidad de la proteína BMAL1 con el inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida en cultivos primarios de BGC.
5. Evaluar la fosforilación de BMAL1 mediante inmunoprecipitación acoplada a inmunodetección en fase sólida en cultivos primarios de BGC.

6. MATERIALES Y MÉTODOS:

6.1 Animales

Los embriones de *Gallus gallus* de 10 días fueron donados por Avi-Mex y conservados a 37 °C hasta su uso. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con las directrices internacionales sobre el uso ético de los animales y teniendo la aprobación específica del Comité de Ética Animal del Cinvestav. Se realizó todo el esfuerzo para reducir el número de embriones utilizados, así como el sufrimiento de éstos.

6.2 Cultivos primarios de BGC

El cultivo primario de BGC fue preparado de acuerdo a lo descrito previamente por Ortega y colaboradores (1991). Embriones de *Gallus gallus* de 14 días fueron decapitados y se extrajeron los cerebelos, los cuales fueron homogenizados mecánicamente empleando agujas de diferentes calibres (16, 18 y 20 mm), el homogenizado fue dejado sedimentar durante 10 min para eliminar residuos de tejido y agregados celulares. Las células obtenidas fueron sembradas a una densidad de 8×10^5 células/mL en medio DMEM complementado con SFB al 10% y 50 µg/mL de gentamicina. Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y utilizadas hasta que alcanzaron una confluencia entre 80-100% (4-6 días).

6.3 Extractos nucleares de BGC

Las células fueron cosechadas mecánicamente y colectadas en solución salina de fosfatos (PBS) (10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 150 mM NaCl pH 7.4) con inhibidores de fosfatasas (10 mM K₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2 mM Na₃VO₄, 25 mM NaF, 10 mM Na₂MoO₄). Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 13,000 RPM a 4 °C durante 5 min. El sobrenadante fue retirado de cada muestra con bomba de vacío y el precipitado fue homogenizado en 150 µL de solución amortiguadora A (1 M HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 50 mM EDTA, 10 mM EGTA, 100 mM DTT, 1 mM PMSF). Posteriormente, las muestras fueron incubadas 20 min a temperatura ambiente (TA) y fueron adicionados 25 µL de Nonidet 40 (NP-40) al 10% y agitadas por 10 seg. El homogenizado fue centrifugado a 10,000 RPM a 4 °C por 1 min. El precipitado obtenido fue resuspendido en 60 µL de solución amortiguadora C fría (1 M HEPES pH 7.9, 4 M

NaCl, 50 mM EDTA, 10 mM EGTA, 100 mM DTT, 1 mM PMSF) y agitado en un vortex a 4 °C por 30 min. Los homogenizados fueron centrifugados a 9,000 RPM a 4 °C por 5 min. Los sobrenadantes (extracto nuclear) fueron separados en fracciones de 20 µL y guardados a -70 °C hasta su uso.

6.4 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas contenidas en los extractos nucleares fue determinada por el método de Bradford (1976) con la finalidad de obtener 75 µg/µL de proteínas nucleares que se resuspendieron en solución amortiguadora de muestra (150 mM TRIS-HCl pH 6.8, 5% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 150 mM DTT, 3% azul de bromofenol y 30% glicerol), usando como estándar una solución de 1 µg/µL de γ-globulina. Posteriormente las muestras fueron sometidas a ebullición por 5 min.

6.5 Detección de BMAL1 por inmunodetección en fase sólida

Cantidades iguales de proteína (aproximadamente 50 µg) fueron separadas en geles de poliacrilamida al 8% en presencia de duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa en cámara de electrotransferencia (Bio-Rad). La membrana fue teñida con Ponceau S para confirmar que las cantidades cargadas de proteína fuesen iguales, y posteriormente fue lavada con PBS hasta desteñir. Se realizó el bloqueo de membrana con leche semidescremada al 5% en TBS con 0.1% de Tween 20 (TBS-Tween 20) con la finalidad de bloquear el exceso de sitios de unión inespecíficos de proteína. Después de 3 lavados con TBS-Tween20, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario BMAL1 (Santa Cruz-8614) a una dilución 1:200 en TBS-Tween20 y 0.25% de BSA durante toda la noche a 4 °C. La membrana fue lavada 3 veces con TBS-tween20 en un agitador orbital e incubada durante 2 h con el anticuerpo secundario anti-cabra acoplado a peroxidasa de rábano en una dilución 1:2000 a TA, seguido por 3 lavados con TBS-Tween20 frío. Finalmente, se añadió a la membrana el reactivo de quimioluminiscencia Amersham como sustrato de la peroxidasa de rábano, la cual cataliza la reacción de oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno emitiendo luz. Las bandas de interés fueron detectadas por autorradiografía y se determinó la intensidad de la señal. Las densidades ópticas de BMAL1 fueron normalizadas con las densidades obtenidas de la

tinción con Ponceau S.

6.6 Inmunoprecipitación de BMAL1

Para cada muestra, 1 μ L de anticuerpo anti-BMAL1 fue colocado con 3 μ L de proteína G acoplada a agarosa, durante 4 h a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, fue agregado 1 mg de extracto de proteína nuclear a la solución que contenía el anticuerpo anti-BMAL1 más la proteína G, y posteriormente fue colocado en agitación constante durante toda la noche a 4 °C. Una vez transcurrido este tiempo, la preparación fue centrifugada a 7000 RPM a 4 °C y la muestra fue decantada para obtener el precipitado. Después, éste fue lavado con PBS 1X y decantado, para obtener de nueva cuenta el precipitado. Por último, al precipitado se le agregaron 30 μ L de SB 3X, y las muestras fueron hervidas durante 5 min. Para el análisis de los resultados se realizó una inmunodetección en fase sólida, como se indica arriba.

6.7 Análisis estadístico

Los experimentos fueron realizados por triplicado para cada condición experimental. Los datos son expresados como la media (promedio) \pm el error estándar de la media (S.E.M.). Se realizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar las diferencias entre las diversas condiciones. Cuando este análisis indicó significancias estadísticas, se empleó la prueba de análisis *post hoc* Student-Newman-Keuls para determinar cuáles condiciones fueron diferentes significativamente entre sí mediante el uso del programa Prism 5, GraphPad Software (San Diego, CA, USA). La significancia estadística fue definida como $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Expresión de BMAL1 en BGC

Usando el modelo de cultivo primario de BGC de cerebelo de *Gallus gallus*, fue detectada la banda característica de 69 KDa de la proteína BMAL1 (Figura 10A), con este resultado fue demostrada la presencia de BMAL1 en la glía de Bergmann. Posteriormente, fue estudiado el papel del Glu en la expresión de BMAL1. Como un primer acercamiento, BGC fueron expuestas a Glu 1 mM y fue observado un incremento significativo en la expresión de la proteína BMAL1 (Figura 10A). Debido a la variabilidad en la detección de los niveles de actina para normalizar los resultados de cada experimento, todos los blots posteriores fueron normalizados con la tinción de Ponceau S (Romero-Calvo et al., 2010; Figura 10B).

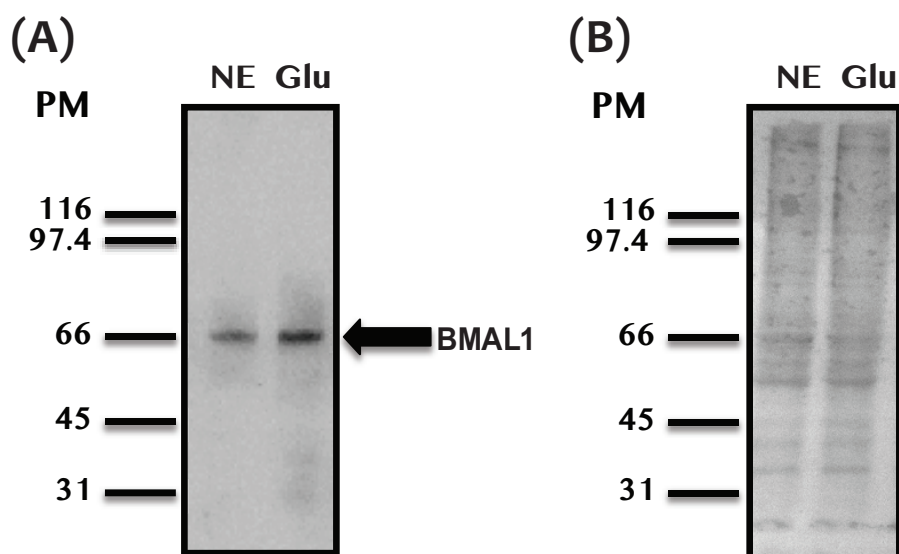


Figura 10. BMAL1 se expresa en BGC. Monocapas de BGC fueron tratadas con vehículo (NE) o Glu 1 mM durante 30 min. Los niveles de BMAL1 fueron detectados mediante inmunodetección en fase sólida con el anticuerpo anti-BMAL1 **(A)** y fueron normalizados con la tinción de Ponceau S **(B)**. Se muestra la autorradiografía de un experimento típico.

7.2 La expresión de BMAL1 es tiempo- y dosisdependiente de Glu

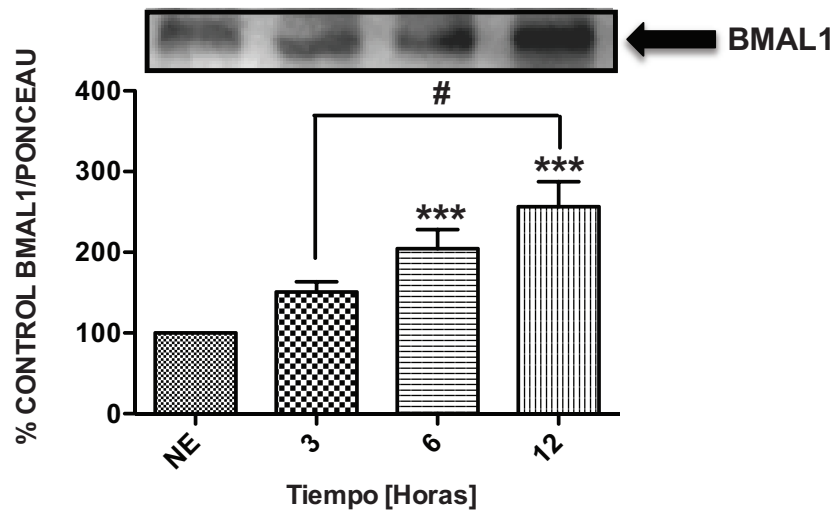


Figura 11. La expresión de BMAL1 es dependiente de tiempo de estimulación con Glu. Monocapas de BGC fueron tratadas con vehículo (NE) o Glu 1 mM durante diferentes periodos de tiempo. Los niveles de expresión de BMAL1 fueron detectados como se describe en la Figura 10. Los datos son expresados como la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Se muestra la autorradiografía de un experimento típico. Se realizó ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre los tratamientos y las células no estimuladas (NE) (** $P < 0.001$). La prueba Newman-Keuls de comparación múltiple fue realizada para analizar el efecto del Glu a diferentes periodos de tiempo con Glu ($\#P < 0.05$).

Para caracterizar más a fondo el efecto de este neurotransmisor, fue evaluada la dependencia de tiempo de estimulación con Glu en el incremento de la proteína BMAL1. Para ello, fueron realizados tratamientos de BGC con Glu 1 mM a diferentes horarios. El tratamiento con Glu durante 6 h es suficiente para incrementar la expresión de esta proteína (Figura 11); por lo tanto, todos los experimentos posteriores fueron realizados a 6 h. Para establecer una relevancia fisiológica de esta expresión, los cultivos de BGC fueron tratados con concentraciones crecientes de Glu. De esta manera, se observó una dependencia clara de la dosis de Glu en el aumento de la expresión de BMAL1 (Figura 12A), estableciéndose una EC_{50} de 451 μ M, sugiriendo un efecto mediado por receptor (Figura 12B). Sin embargo, ha sido reportado que la concentración de Glu en la hendidura sináptica está estimada que se encuentra en el rango milimolar bajo (Danbolt, 2001); por lo tanto, los experimentos posteriores fueron realizados con una concentración de Glu 1 mM.

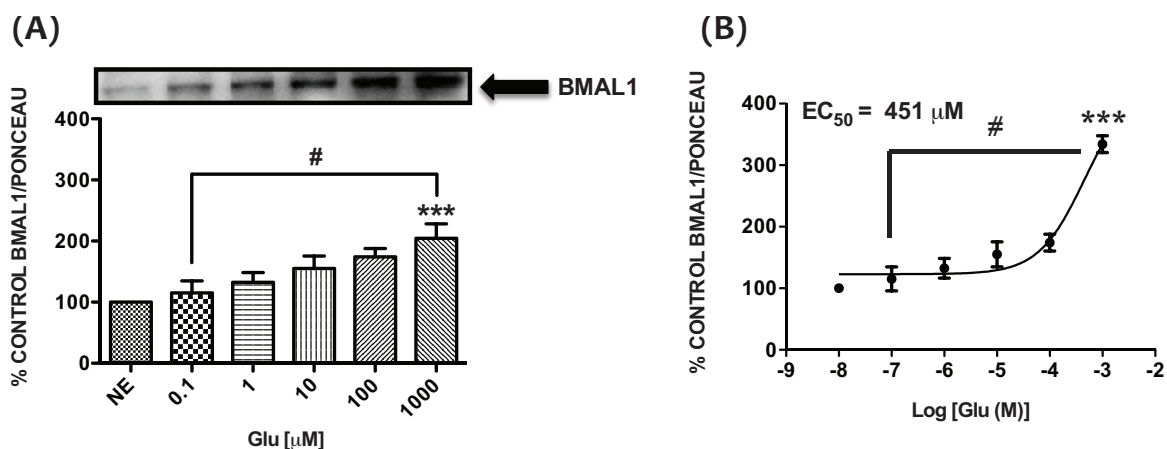


Figura 12. La expresión de BMAL1 es dependiente de dosis de Glu. (A) monocapas de BGC fueron tratadas con vehículo (NE) o concentraciones crecientes de Glu durante 6 h. Los niveles de expresión de BMAL1 fueron detectados como se describe en la Figura 10. (B) Regresión no lineal de la incubación con concentraciones crecientes de Glu durante 6 h. Los datos son expresados como la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Se muestra la autorradiografía de un experimento típico. Se realizó ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre los tratamientos y las células no estimuladas (NE) (** $P < 0.001$). En el panel A fue realizada la prueba Newman-Keuls de comparación múltiple para analizar el efecto del Glu con diferentes concentraciones de Glu ($\#P < 0.05$).

7.3 Caracterización farmacológica de la expresión de BMAL1 dependiente de Glu

Mediante el uso de herramientas farmacológicas fue determinado el perfil del incremento de BMAL1 en respuesta a Glu; para lo cual, se emplearon agonistas específicos de los receptores ionotrópicos: KA 250 μM , AMPA 500 μM ó NMDA 500 μM + glicina 10 μM ; así como de agonistas de los receptores metabotrópicos: DHPG 25 μM (para el grupo I) ó L-AP4 500 μM (para el grupo III). Como se muestra en la Figura 13, el agonista de los iGluRs AMPA, al igual que el agonista de los mGluRIs DHPG incrementaron la expresión de BMAL1 en cultivos de BGC. Sin embargo, los agonistas KA, NMDA ó L-AP4 no fueron capaces de mimetizar el efecto del Glu (Figura 13).

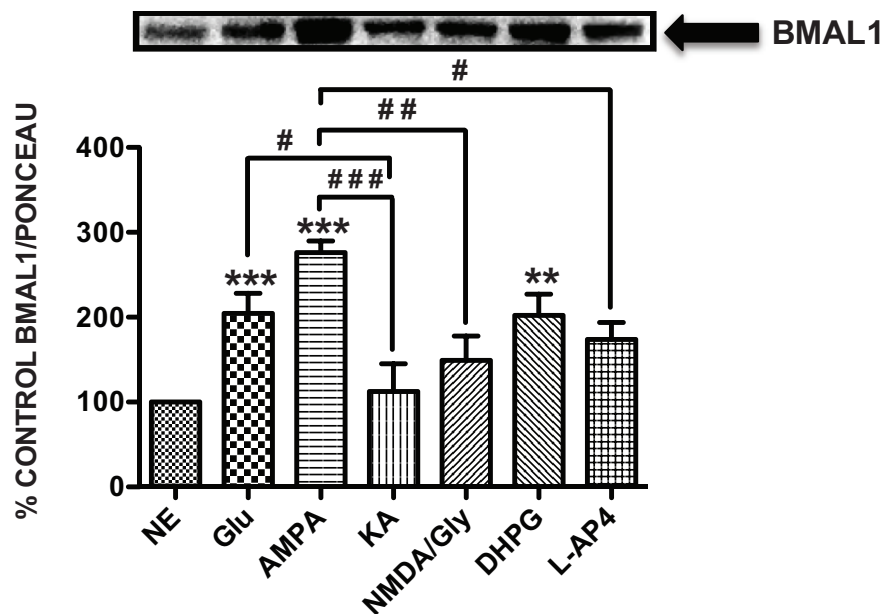


Figura 13. Los receptores de Glu participan en la expresión de BMAL1 inducida por Glu. Monocapas de BGC fueron tratadas durante 6 h con el vehículo (NE), Glu 1 mM o el agonista de Glu indicado; AMPA 500 μ M, KA 250 μ M, NMDA 500 μ M + glicina 10 μ M, DHPG 25 μ M o L-AP4 500 μ M. Los niveles de expresión de BMAL1 fueron detectados como se describe en la Figura 10. Los datos son expresados como la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Se muestra la autorradiografía de un experimento típico. Se realizó ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre los tratamientos y las células no estimuladas (NE) (** P <0.01, *** P <0.001). La prueba Newman-Keuls de comparación múltiple fue realizada para analizar el efecto de AMPA (# P <0.05, ## P <0.01, ### P <0.001).

Para evaluar la contribución de la respuesta glutamatérgica ionotrópica y metabotrópica, fueron empleados antagonistas específicos de los receptores de Glu (DNQX 50 μ M [un antagonista de los receptores AMPA] ó CPCCOEt 100 μ M [un antagonista de los receptores metabotrópicos de Glu del grupo I]). Como se esperaba, ambos antagonistas, DNQX y CPCCOEt fueron capaz de reducir la respuesta del Glu y del DHPG, sugiriendo que los receptores AMPA y metabotrópicos de Glu (grupo I) están implicados en el efecto del Glu (Figuras 14A y 14B).

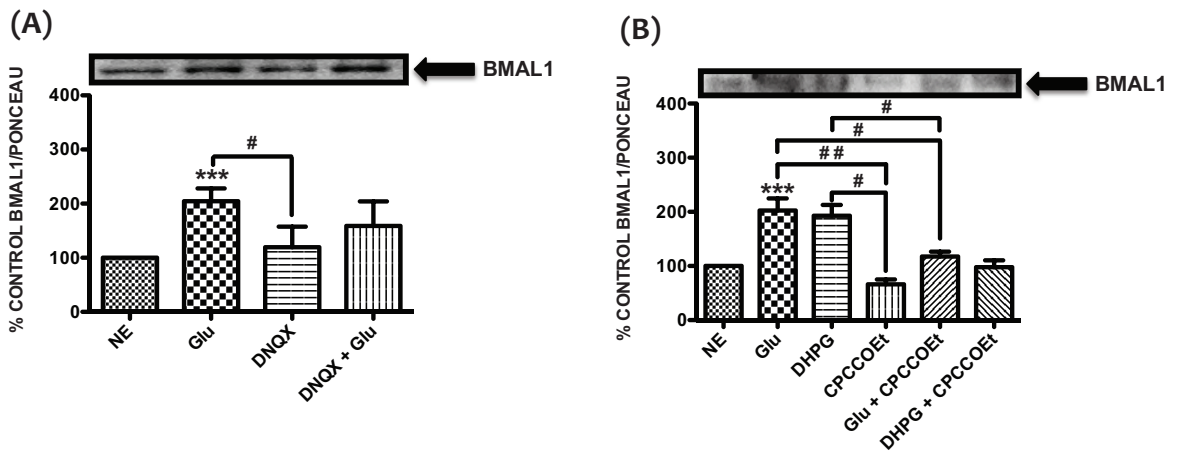


Figura 14. Los receptores AMPA y mGluRs median la respuesta del Glu en la expresión de BMAL1. (A) Monocapas de BGC fueron incubadas durante 30 min con DNQX 50 μ M (antagonista de los receptores AMPA) antes del estímulo con Glu 1 mM por 6 h. (B) Monocapas de BGC fueron pre-incubadas con CPCCOEt 100 μ M (un antagonista de los mGluRIs) durante 30 min antes de la exposición con Glu 1 mM o DHPG 25 μ M durante 6 h. Los niveles de expresión de BMAL1 fueron detectados como se describe en la Figura 10. Los datos son expresados como la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Se muestra la autorradiografía de un experimento típico. Se realizó ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre los tratamientos y las células no estimuladas (NE) (*** P <0.001). La prueba Newman-Keuls de comparación múltiple fue realizada para analizar el efecto de los antagonistas de Glu y el efecto del DHPG (# P <0.05, ### P <0.01).

Con la finalidad de analizar la participación de los transportadores de Glu en la expresión de la proteína BMAL1, fueron empleados el D-Aspartato y el inhibidor transportable THA (1 mM). Los resultados muestran un aumento discreto en la expresión de BMAL1 al ser estimulado con el D-Aspartato, mientras que el THA parece no tener algún efecto en la expresión de esta proteína (Figura 15).

Con el objetivo de explorar si el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ está implicado en la expresión de BMAL1 dependiente de Glu, fueron utilizados un bloqueador del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (KB-R7943 15 μ M) y un ionóforo de Ca^{+2} (A23187 10 μ M). Los resultados mostrados en la Figura 16 indican que el bloqueador selectivo del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, elimina la respuesta del Glu. En resumen, la expresión de BMAL1 dependiente de Glu es regulada mediante los receptores ionotrópicos (AMPA) y

metabotrópicos (grupo I) de Glu. Además, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ también está implicado en la expresión de esta proteína reloj.

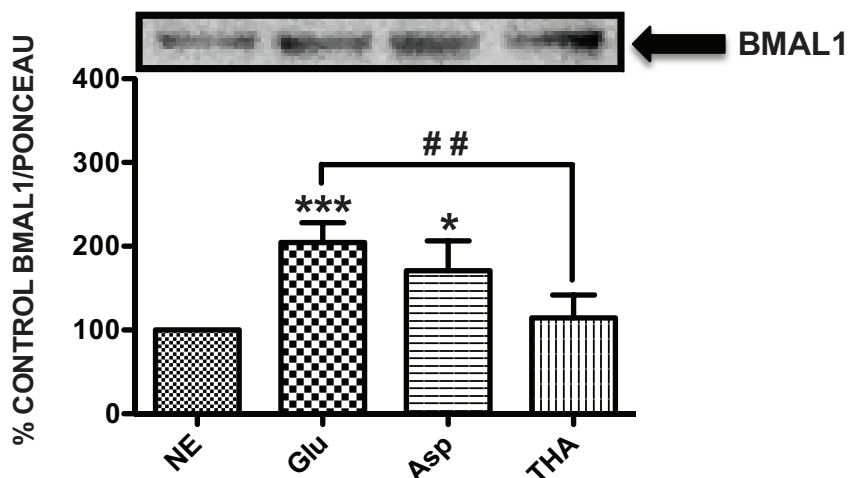


Figura 15. GLAST participa en la expresión de BMAL1 dependiente de Glu. Monocapas de BGC fueron incubadas con el vehículo (NE), Glu 1 mM, aspartato (Asp) 1 mM, o el bloqueador del transportador de Glu, THA 100 μM , durante 6 h. Los niveles de expresión de BMAL1 fueron detectados como se describe en la Figura 10. Los datos son expresados como la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Se muestra la autorradiografía de un experimento típico. Se realizó ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre los tratamientos y las células no estimuladas (NE) (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$). La prueba Newman-Keuls de comparación múltiple fue realizada para analizar el efecto del bloqueador del transportador de Glu ($^{\#\#}P < 0.01$).

7.4 El Glu estabiliza a la proteína BMAL1

Posteriormente, para evaluar si el efecto del Glu es resultado de un aumento en el tiempo de vida media de BMAL1, fue necesario el uso de cicloheximida 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CHX) con la finalidad de bloquear la síntesis *de novo* de proteínas (Figura 17A). Los resultados obtenidos muestran un aumento en la expresión de BMAL1, señalando que el Glu probablemente participa en la regulación de esta proteína reloj. Con estos resultados, el siguiente paso del estudio, fue evaluar el efecto de cada estímulo por separado en la expresión de BMAL1 considerando el tiempo en el cual el efecto dependiente de Glu está presente (6 h). Los resultados fueron indicativos de un aumento en el tiempo de vida media de BMAL1, y ya que el tratamiento con CHX no fue capaz de disminuir los niveles de BMAL1 cuando el estímulo de Glu estuvo o no

presente (Figura 17B), sugiere que el Glu probablemente regula la estabilidad de BMAL1.

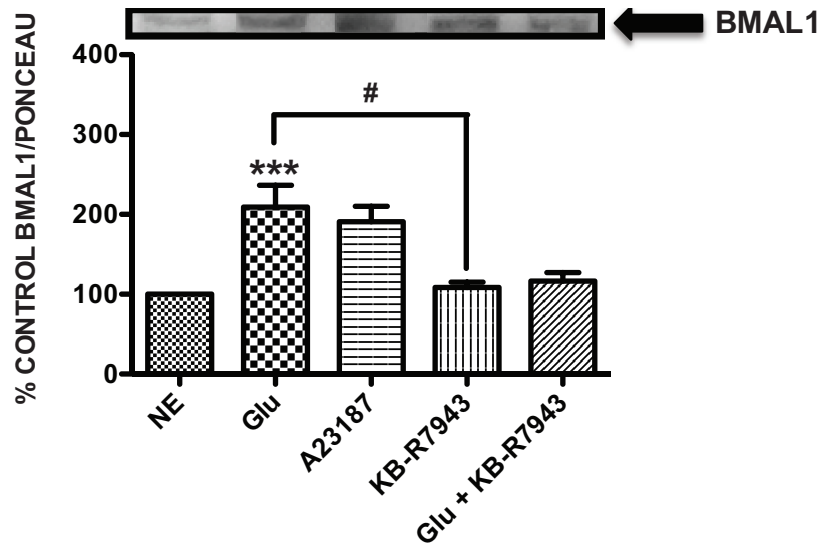


Figura 16. El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ está implicado en la expresión de BMAL1 inducida por Glu. Monocapas de BGC fueron pre-expuestas durante 30 min con KB-R7943 15 μM (un bloqueador del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$) y luego a Glu 1 mM ó A23187 10 μM (ionóforo de Ca^{+2}) durante 6 h. Los niveles de expresión de BMAL1 fueron detectados como se describe en la Figura 10. Los datos son expresados como la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Se muestra la autorradiografía de un experimento típico. Se realizó ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre los tratamientos y las células no estimuladas (NE) (***) $P < 0.001$). La prueba Newman-Keuls de comparación múltiple fue realizada para analizar el efecto del bloqueador del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (#) $P < 0.05$).

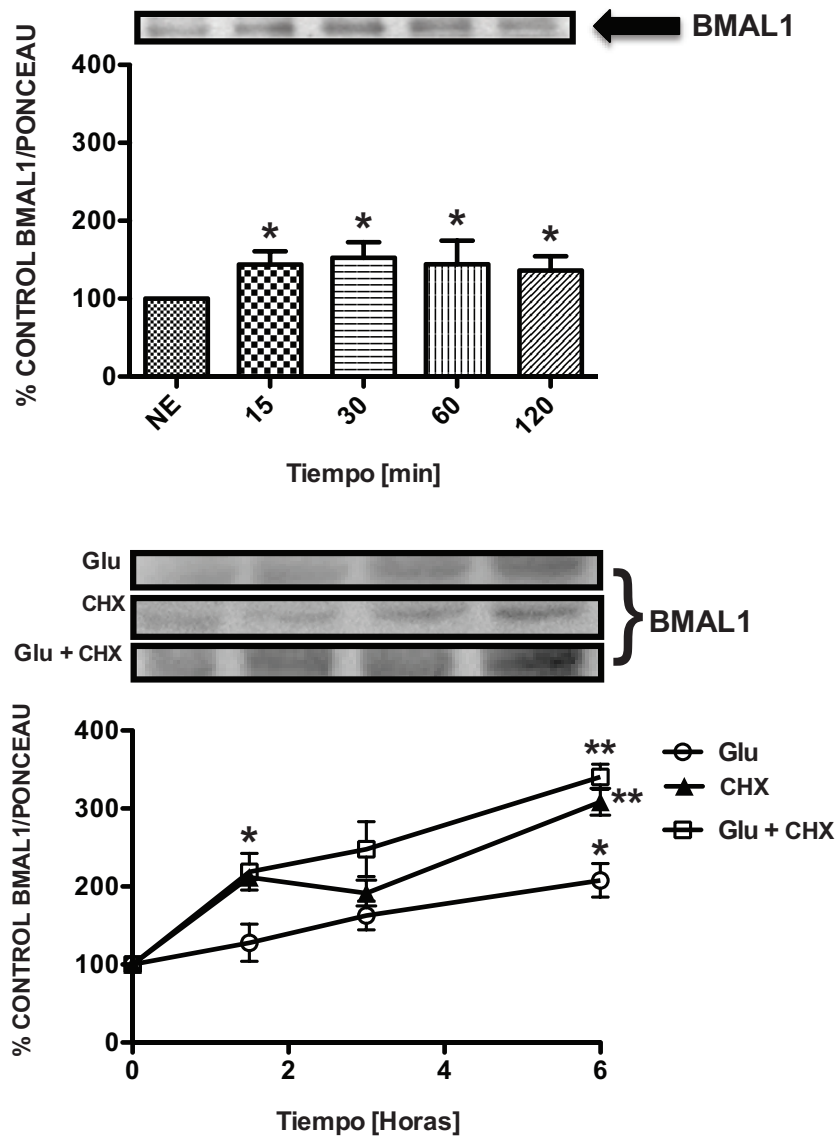


Figura 17. El Glu estabiliza a la proteína BMAL1. (A) Monocapas de BGC fueron incubadas durante 30 min con CHX 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antes del estímulo con Glu 1 mM en los periodos de tiempo indicados. (B) Monocapas de BGC fueron incubadas con Glu 1 mM (círculos blancos), CHX 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (cuadrados blancos) ó Glu 1 mM más CHX 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (triángulos negros) en los periodos de tiempo indicados. Los niveles de expresión de BMAL1 fueron detectados como se describe en la Figura 10. Los datos son expresados como la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Se muestra la autorradiografía de un experimento típico. Se realizó ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre los tratamientos y las células no estimuladas (0 h) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

7.5 La expresión de BMAL1 es regulada a través de las proteínas PKA y PKC

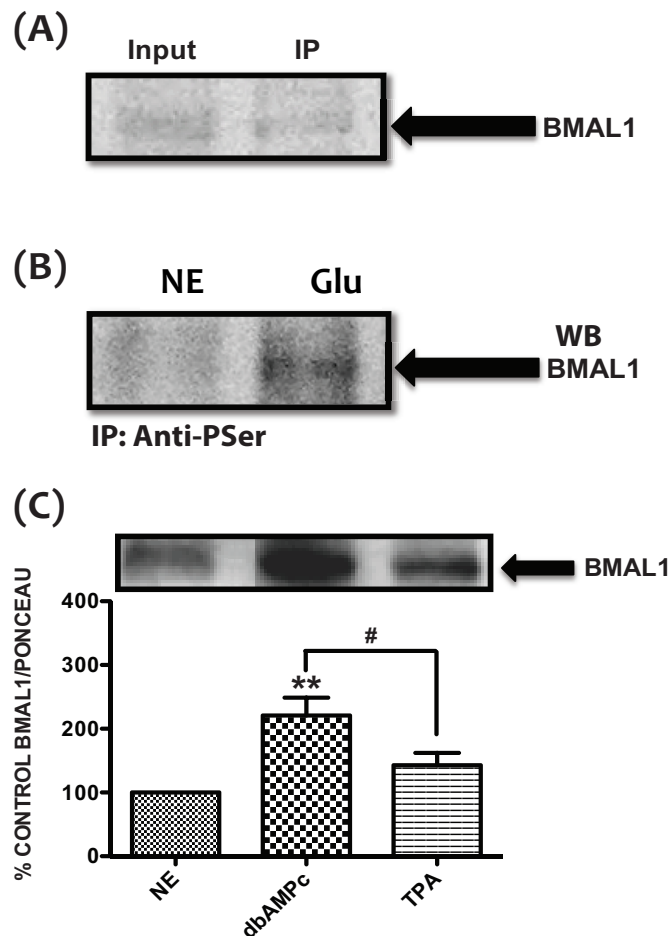


Figura 18. PKA y PKC participan en la regulación de la expresión de BMAL1. (A) Monocapas de BGC fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-fosfoserina y el inmunoprecipitado analizado por Western blot con el anticuerpo anti-BMAL1. (B) Monocapas de BGC fueron expuestas al vehículo (NE) o a Glu 1 mM. Los extractos totales fueron inmunoprecipitados con anti-fosfoserina y luego sujetos a Western blot para su análisis con anti-BMAL1. (C) monocapas de BGC fueron tratadas durante 6 h con el vehículo (NE), db-cAMP 500 μ M o TPA 100 nM. Los niveles de expresión de BMAL1 fueron detectados como se describe en la Figura 10. Los datos son expresados como la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Se muestra la autorradiografía de un experimento típico. Se realizó ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre los tratamientos y las células no estimuladas (NE) (** $P < 0.01$). En el panel C fue realizada la prueba Newman-Keuls de comparación múltiple para analizar el efecto del db-AMPc contra el efecto del TPA (# $P < 0.05$).

Con los resultados obtenidos en los estudios del bloqueo de la síntesis *de novo* de proteínas, la pregunta que surgió fue si la proteína BMAL1 es fosforilada por PKC, lo cual conduce a la estabilización de BMAL1. Para este fin, fueron realizados ensayos de inmunoprecipitación acoplados por identificación con Western blot (Figura 18A). Las autorradiografías presentadas en la Figura 18B muestran la inmunoprecipitación de los lisados de BGC con el anticuerpo anti-fosfoserina (PSer) y el análisis de inmunoprecipitación en fase sólida con el anticuerpo anti-BMAL1; lo cual, permite apreciar que BMAL1 es fosforilada en un residuo de serina cuando las BGC son estimuladas con una concentración de Glu 1 mM. Interesantemente, la exposición de las células en cultivos a dibutilil-AMPc (db-AMPc) 500 nM, un activador de la proteína cinasa A (PKA); o al análogo del diacilglicerol tetradecanoilforbol 13-acetato (Tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA), resulta en un aumento en los niveles de BMAL1, similar al efecto descrito del Glu (Figura 18C).

8. DISCUSIÓN

A más de dos décadas de conocer que las proteínas reloj oscilan en varias regiones del cerebro, Akiyama y colaboradores (1999) demostraron la presencia de la proteína PER en la corteza cerebelar; mientras que el equipo de trabajo de Namihira (1999) reportaron que las proteínas reloj CLOCK y BMAL1 son expresadas en la capa granular del cerebelo. Particularmente, en este estudio fue demostrada la presencia de la proteína reloj BMAL1 en las BGC.

Las células gliales expresan diferentes subtipos de receptores y transportadores de Glu (López-Bayghen et al., 2003b); no obstante, aunque en la glía la captura de este neurotransmisor no está regulada de manera circadiana, es sabido que es modulada por la expresión de genes reloj, incluido *Bmal1* (Beaule et al., 2009). Al estudiar la participación del Glu en la expresión de la proteína BMAL1, los resultados indican que el aumento en la expresión de esta proteína reloj se debe a la interacción del Glu con los receptores AMPA y los mGluRIs (Figura 13); en las BGC el grupo de receptores AMPA está integrado básicamente de las subunidades GRIA1, GRIA3 y GRIA4, los cuales son permeables a Ca^{+2} (López et al., 1994; Müller et al., 1992); en contraste, los mGluRIs están ligados al metabolismo del fosfatidilinositol y a la liberación de Ca^{+2} del retículo endoplásmico. No obstante, los receptores NMDA no parecen estar relacionados con la regulación de los niveles de BMAL1 en las BGC. Contrario a nuestros resultados, Tamaru y colaboradores (2000) demostraron que al estimular rebanadas de NSQ con Glu y NMDA, los niveles de la proteína BMAL1 son reducidos drásticamente, presumiblemente por degradación.

Teniendo en consideración que los transportadores de Glu han sido descritos como transductores de señal (Martínez-Lozada et al., 2011), nuestros hallazgos en torno a la participación de los transportadores de Glu en relación a BMAL1 sugieren que el influjo de Na^{+} a través del transportador no es necesario para el aumento en la expresión de BMAL1 dependiente de Glu (Figura 15). En otro punto, el hecho de que el estímulo con KB-R7943 eliminara la respuesta del Glu sugiere que el cotransporte de Glu y Na^{+} conduce a la activación del intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$, el cual parece estar implicado en la expresión de la proteína reloj en las BGC (Figura 16). Hasta el

momento, no se conoce si los mecanismos de señalización empleados por los receptores y transportadores de Glu convergen para estabilizar a BMAL1, pero puede especularse que el aumento en los niveles de Ca^{+2} intracelular desencadena una serie de eventos que incrementan a esta proteína.

Cabe señalar que en este trabajo es reportado por primera vez en la literatura la implicación del Glu en la regulación de la proteína BMAL1. Los resultados señalan que este neurotransmisor probablemente activa diferentes cascadas de transducción de señales implicadas en la regulación de BMAL1, que dan lugar a una proteína BMAL1 sumamente estable, con un tiempo de vida media superior a las 12 horas (Figura 17); el cual, es más alto que el tiempo de vida media de cualquier otra proteína reloj (Guilding y Piggins, 2007). Es posible que una de las formas en la cual el Glu regula a BMAL1 sea mediante la fosforilación de las proteínas cinasas PKA y PKC, ya que como puede observarse, ambas cinasas incrementan la expresión de BMAL1 (Figura 18). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Zhang y colaboradores en el 2012, en donde mencionan que la proteína PKC (cinasa dependiente de Ca^{+2} /diacilglicerol) facilita la escisión de la ubiquitina y previene la formación de cadenas poliubiquitinadas en BMAL1, evitando así su degradación por el proteosoma 26S (Saito y Shirai, 2002) y conduciendo a la estabilización de BMAL1 (Figuras 17 y 18). Aunado a esto, existe evidencia que demuestra que la familia de las proteínas PKC está implicada en el reajuste de fase del reloj circadiano (Jakubcakova et al., 2007; Shim et al., 2007). En relación con PKA, es poco lo que se conoce sobre su participación en los ritmos circadianos y las proteínas reloj, específicamente su relación con BMAL1, por lo que es importante analizar el mecanismo del efecto estabilizador de la activación de PKA.

Por último, es importante mencionar que los resultados de este estudio son la base para comprender la función de los receptores gliales de Glu en la regulación molecular de los ritmos circadianos (Figura 19), por lo que resulta de interés continuar estudiando esta línea de investigación.

9. CONCLUSIONES DE LOS OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Las BGC expresan BMAL1.

- ❖ El Glu regula la expresión de BMAL1 en cultivos de BGC de manera dependiente de tiempo y dosis.

- ❖ La estimulación de las BGC con Glu durante 6 h, es suficiente para que aumente la expresión de BMAL1.

- ❖ Los receptores AMPA (iGluRs) y los mGluRs; así como, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ regulan la expresión de BMAL1 dependiente de Glu.

- ❖ El Glu probablemente regula la estabilidad de BMAL1.

- ❖ Las proteínas PKA y PKC podrían estar implicadas en la estabilidad de BMAL1.

10. CONCLUSIÓN DE LA TESIS: El Glu regula de manera traduccional a la proteína BMAL1 en BGC.

11. MODELO PROPUESTO DE LA REGULACIÓN DE BMAL1 DEPENDIENTE DE Glu

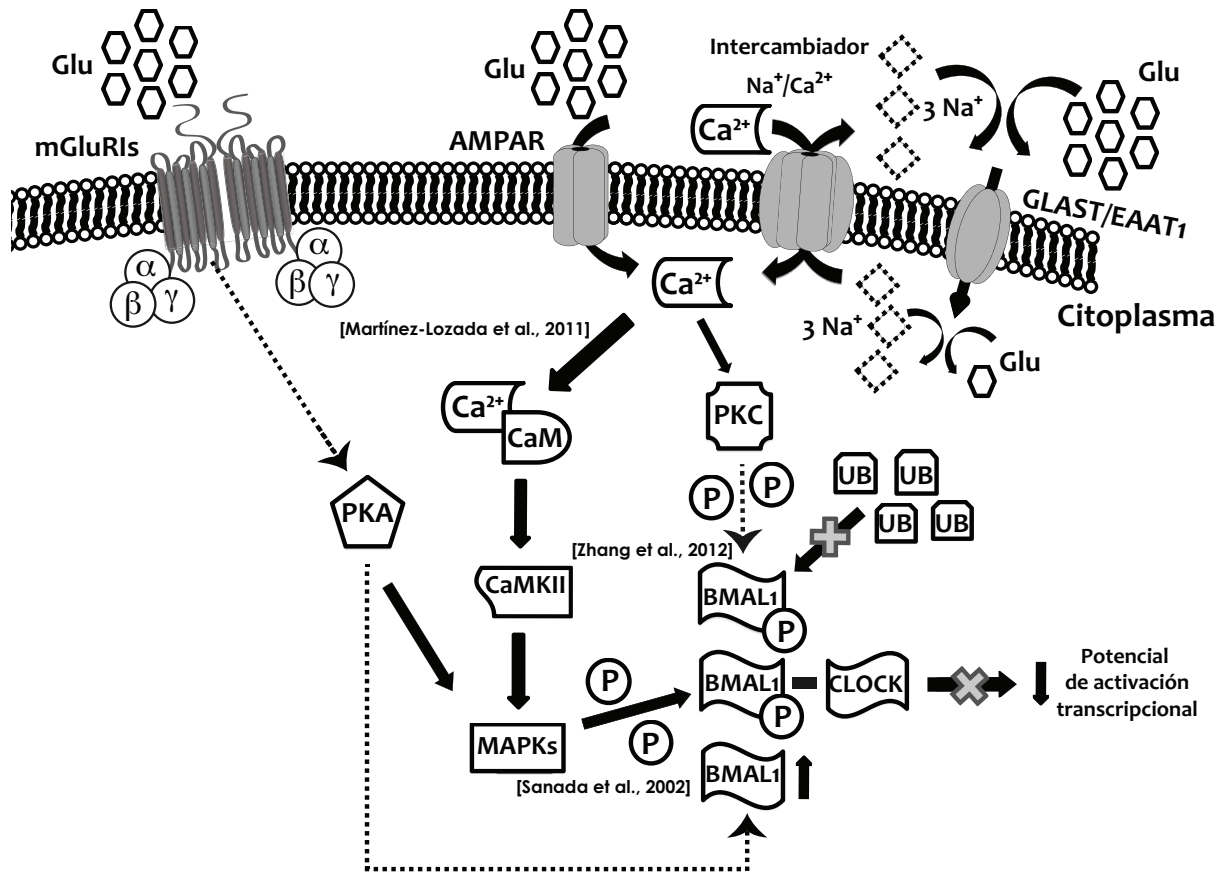


Figura 19. Modelo de la regulación de BMAL1 dependiente de Glu en BGC. Uno de los sustratos de PKA es BMAL1, el cual favorece el incremento de los niveles de esta proteína. La estimulación de los receptores AMPA en las BGC induce un influjo de Ca^{+2} , que se une sucesivamente a la calmodulina (CaM) activando a la proteína cinasa II dependiente de Ca^{+2} /Calmodulina (CaMKII) (Martínez-Lozada et al., 2011), el cual a su vez activa a MAPK. Además, el Ca^{+2} activa a la proteína PKC. Posteriormente, PKC fosforila a BMAL1 en el sitio S269, impidiendo la ubiquitinación (UB) de BMAL1, y por lo tanto, estabilizando a la proteína (Zhang et al., 2012). Por otro lado, la captura de Glu conduce a un influjo de Na^+ , el cual activa al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, aumentando los niveles de Ca^{+2} intracelular e induciendo la activación de CaMKII y PKC. Otro de los sustratos del Ca^{+2} es la proteína PKA. Dentro de los sustratos de PKA está MAPK, la cual fosforila a BMAL1 en el sitio Thr-534 resultando en una disminución del potencial de activación transcripcional del heterodímero CLOCK-BMAL1 (Sanada et al., 2002).

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M y Block GD. (2002). Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci*, 22(1):350-356.
2. Abraham U, Granada AE, Westermark PO, Heine M, Kramer A y Herzog H. (2010). Coupling governs entrainment range of circadian clocks. *Mol Syst Biol*, 6(438):1-13.
3. Akiyama M, Kirihara T, Takahashi S, Minami Y, Yoshinobu Y, Moriya T y Shibata S. (1999). Modulation of mPer1 gene expression by anxiolytic drugs in mouse cerebellum. *Br J Pharmacol*, 128(7):1616-1622.
4. Albers HE, Liou SY, Stopa EG y Zoeller RT. (1992). Neurotransmitter colocalization and circadian rhythms. *Prog Brain Res*, 92:289-307.
5. Anderson CM y Swanson RA. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, 32(1):1-14.
6. Ángeles-Castellanos M, Rodríguez K, Salgado-Delgado R y Escobar C. (2007). Anatomía de un reloj (anatomía del sistema circadiano). *Arch Mex Anat Nueva Época*, 2(1):15-20.
7. Aschoff J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 25(1):11-28.
8. Balsalobre A. (2002). Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res*, 309(1):193-199.
9. Balsalobre A, Damiola F y Schibler U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Cell*, 93:929-937.
10. Beaule C, Swannstrom A, Leone MJ y Herzog ED. (2009). Circadian modulation of gene expression, but not glutamate uptake, in mouse and rat cortical astrocytes. *PLoS One*, 4:e7476.
11. Bleakman D, Alt A y Nisenbaum ES. (2006). Glutamate receptors and pain. *Semin Cell Dev Biol*, 17(5):592-604.
12. Borgs L, Beukelaers P, Vandenbosch R, Belachew S, Nguyen L y Malgrange B. (2009). Cell circadian cycle. New role for mammalian core clock genes. *Cell Cycle*, 8(6):832-837.
13. Bourdon L y Buquet A. (2004). Bases de la chronobiologie: les rythmes nycthémeraux. *J Fr Ophthalmol*, 27(Hors série 2):2S5-2S10.
14. Bradford HF. (1988). Fundamentos de neuroquímica. Labor, Barcelona.
15. Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analyt Biochem*, 72:248- 254.
16. Camacho A y Massieu L. (2006). Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res*, 37(1):11-18.
17. Card JP y Moore RY. (1989). Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. *J Comp Neurol*, 284(1):135-147.
18. Cardone L, Hirayama J, Giordano F, Tamaru T, Palvimo JJ y Sassone-Corsi P. (2005). Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science*, 309:1390-1394.
19. Cassone VM, Warren WS, Brooks DS y Lu J. (1993). Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms. *J Biol Rhythms*, (Suppl 8):S73-S81.

20. Castel M, Belenky M, Cohen S, Ottersen OP y Storm-Mathisen J. (1993). Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, 5:368-381.
21. Cermakian N y Sassone-Corsi P. (2000). Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(1):59-67.
22. Challet E. (2007). Clock genes, circadian rhythms and food intake. *Pathol Biol*, 55(3-4):176-177.
23. Chen L, Tracy T y Nam CI. (2007). Dynamics of postsynaptic glutamate receptor targeting. *Curr Opin Neurobiol*, 17(1):53-58.
24. Choi HJ, Lee CJ, Schroeder A, Kim YS, Jung SH, Kim JS, Kim do Y, Son EJ, Han HC, Hong SK, Colwell CS y Kim YI. (2008). Excitatory actions of GABA in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci*, 28(21):5450-5459.
25. Chung S, Son GH y Kim K. (2011). Adrenal peripheral oscillator in generating the circadian glucocorticoid rhythm. *Ann NY Acad Sci*, 1220(1):71-81.
26. Conn PJ y Pin JP. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37:205-237.
27. Cooper JR, Bloom FE y Roth RH. (1996). The biochemical basis of neuropharmacology. 7ª ed. Oxford: Oxford University Press, New York.
28. Corti C, Restituto S, Rimland JM, Brabet I, Corsi M, Pin JP y Ferraguti F. (1998). Cloning and characterization of alternative mRNA forms for the rat metabotropic glutamate receptors mGluR7 and mGluR8. *Eur J Neurosci*, 10:3629-3641.
29. Curtis DR, Phillis JW y Watkins JC. (1959). Chemical excitation of spinal neurons. *Nature*, 183:611-612.
30. Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F y Schibler U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev*, 14(23):2950-2961.
31. Danbolt NC. (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, 65(1): 1-105.
32. De Gortari P y Joseph-Bravo P. (2009). Artículo de revisión: Las neuronas TRHérgicas como reguladores de la homeostasis energética. *Medicina Universitaria*, 11(42):36-43.
33. Delgado-García JM. (2001). Structure and function of the cerebellum. *Rev Neurol*, 33(7):635-642.
34. Dibner C, Sage D, Unser M, Bauer C, d'Eysmond T, Naef F y Schibler U. (2009). Circadian gene expression is resilient to large fluctuations in overall transcription rates. *EMBO J*, 28(2):123-134.
35. Ding JM, Cheng D, Weber ET, Faiman LE, Rea MA y Gillette MU. (1994). Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shift by glutamate and NO. *Science*, 266: 1713-1717.
36. Dingledine R y McBain CJ. (1994). Excitatory amino acids transmitters. En: *Basic neurochemistry* (Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB, eds.). 1ª ed. Raven Press, New York. Págs. 367-387.
37. Doi M, Hirayama J y Sassone-Corsi P. (2006). Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell*, 125:497-508.
38. Dunlap JC. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96(2):271-290.
39. Eide EJ, Vielhaber EL, Hinz WA y Virshup DM. (2002). The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase I ϵ . *J Biol Chem*, 277:17248-17254.

40. Etchegaray JP, Lee C, Wade PA y Reppert SM. (2003). Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature*, 421:177-182.
41. Farnell YZ, Allen GC, Hahm SS, Neuendorff N, West JR, Chen WJ y Earnest DJ. (2008). Neonatal alcohol exposure differentially alters clock gene oscillations within the suprachiasmatic nucleus, cerebellum, and liver of adults rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 32(3):544-552.
42. Feillet CA, Albrecht U y Challet E. (2006). Feeding time for the brain: a matter of clocks. *J Physiol Paris*, 100(5-6):252-260.
43. Feillet CA, Mendoza J, Albrecht U, Pevet P y Challet E. (2008). Forebrain oscillators ticking with different clock hands. *Mol Cell Neurosci*, 37: 209-221.
44. Fields RD y Stevens-Graham B. (2002). New insights into neuron-glia communication. *Science*, 298(5593):556-562.
45. Flor PJ, Van Der Putten H, Ruegg D, Lukic S, Leonhardt T, Bence M, Sansig G, Knopfel T y Kuhn R. (1997). A novel splice variant of a metabotropic glutamate receptor, human mGluR7b. *Neuropharmacol*, 36:153-159.
46. Follett BK y Sharp PJ. (1969). Circadian rhythmicity in photoperiodically induced gonadotrophin release and gonadal growth in the quail. *Nature*, 223(5209):968-971.
47. Fonnum F. (1993). Regulation of the synthesis of the transmitter glutamate pool. *Prog Biophys Molec Biol*, 60:47-57.
48. Francl JM, Kaur G y Glass JD. (2010). Roles of light and serotonin in the regulation of gastrin-releasing peptide and arginine vasopressin output in the hamster SCN circadian clock. *Eur J Neurosci*, 32(7):1170-1179.
49. Gallego M y Virshup DM. (2007). Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:139-148.
50. Gannon RL y Rea MA. (1994). In situ hybridization of antisense mRNA oligonucleotides for AMPA, NMDA and metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat suprachiasmatic nucleus at different phases of the circadian cycle. *Mol Brain Res*, 23:338-344.
51. Glass JD, Guinn J, Kaur G y Francl JM. (2010). On the intrinsic regulation of neuropeptide Y release in the mammalian suprachiasmatic nucleus circadian clock. *Eur J Neurosci*, 31(6):1117-1126.
52. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X y Seto E. (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*, 363:15-23.
53. Golombek DA y Rosenstein RE. (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev*, 90(3):1063-1102.
54. Gorbacheva VY, Kondratov RV, Zhang R, Cherukuri S, Gudkov AV, Takahashi JS y Antoch MP. (2005). Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK/BMAL1 transactivation complex. *Proc Natl Acad Sci*, 102:3407-3412.
55. Graham MD y Pfau JG. (2010). Differential regulation of female sexual behaviour by dopamine agonists in the medial preoptic area. *Pharmacol Biochem Behav*, 97(2):284-292.
56. Granados-Fuentes D, Prolo LM, Abraham U y Herzog ED. (2004). The suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain, circadian rhythmicity in the olfactory bulb. *J Neurosci*, 24(3):615-619.
57. Grewer C, Gameiro A, Zhang Z, Tao Z, Braams S y Rauen T. (2008). Glutamate forward

- and reverse transport: from molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia. *IUBMB Life*, 60(9):609-619.
58. Griffiths RA. (1986). Natural environmental cues and circadian rhythms of behaviour-a perspective. *Chronobiol Int*, 3(4):247-253.
 59. Guilding C y Piggins HD. (2007). Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *Eur J Neurosci*, 25: 3195-3216.
 60. Hamada T, LeSauter J, Venuti JM y Silver R. (2001). Expression of Period genes: rhythmic and nonrhythmic compartments of the suprachiasmatic nucleus pacemaker. *J Neurosci*, 21(19):7742-7750.
 61. Harmer SL, Panda S y Kay SA. (2001). Molecular bases of circadian rhythms. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17:215-253.
 62. Hernández-Muela S, Mulas F y Mattos L. (2005). Contribución del cerebelo a los procesos cognitivos. *Rev Neurol*, 40:57-64.
 63. Hernández PR, Cadena OD, Talavera RLJ, Samano AMG, Aparicio LM, Ochoa RGF, García CME y Ortiz PLB. (2004). Ritmos biológicos. *Variabilidad horaria en nacimientos humanos (1ª Parte)*. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 9(003):37-42.
 64. Hertz L y Zielke HR. (2004). Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci*, 27:735-743.
 65. Hirayama J, Sahar S, Grimaldi B, Tamaru T, Takamatsu K, Nakahata Y y Sassone-Corsi P. (2007). CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature*, 450:1086-1090.
 66. Hirayama J y Sassone-Corsi P. (2005). Structural and functional features of transcription factors controlling the circadian clock. *Curr Opin Genet Dev*, 15:548- 556.
 67. Honma S, Katsuno Y, Shinohara K, Abe H y Honma KI. (1996). Circadian rhythm and response to light of extracellular glutamate and aspartate in rat suprachiasmatic nucleus. *Am J Physiol*, 40: 579-585.
 68. Iбата Y, Okamura H, Tanaka M, Tamada Y, Hayashi S, Iijima N, Matsuda T, Munekawa K, Takamatsu T, Hisa Y, Shigeyoshi Y y Amaya F. (1999). Functional morphology of the suprachiasmatic nucleus. *Front Neuroendocrinol*, 20(3):241-268.
 69. Ikeda M e Ikeda M. (2014). Bmal1 is an essential regulator for circadian cytosolic Ca²⁺ rhythms in suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci*, 34:12029-12038.
 70. Izumo M, Johnson CH y Yamazaki S. (2003). Circadian gene expression in mammalian fibroblasts revealed by real-time luminescence reporting: Temperature compensation and damping. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(26):16089-16094.
 71. Jakubcaková V, Oster H, Tamanini F, Cadenas C, Leitges M, Van der Horst GT y Eichele G. (2007). Light entrainment of the mammalian circadian clock by a PRKCA-dependent posttranslational mechanism. *Neuron*, 54:831-843.
 72. Jessen KR. (2004). Cells in focus Glial cells. *Intl J Biochem Cell Biol*, 36:1861-1867.
 73. Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, de Vries GJ y Reppert SM. (1999). A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell*, 96(1):57-68.
 74. Johnson RF, Moore RY y Morin LP. (1988). Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res*, 460(2):297-313.
 75. Kampf-Lassin A, Wei J, Galang J y Prendergast BJ. (2011). Experience-independent development of the hamster circadian visual system. *PLoS One*, 6(4):e16048.

76. Kennaway DJ. (2005). The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Hum Reprod Update*, 11:91-101.
77. Knauth P y Rutenfranz J. (1976). Experimental shift work studies of permanent night, and rapidly rotating, shift systems. *Int Arch Occup Environ Hlth*, 37:125-137.
78. Ko CH y Takahashi JS. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet*, 15 Spec No 2:R271-R277.
79. Kohsaka A y Bass J. (2006). A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 18 (1):4-11.
80. Kondratov RV, Chernov MV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Gudkov AV y Antoch MP. (2003). BMAL1-dependent circadian oscillation of nuclear CLOCK: posttranslational events induced by dimerization of transcriptional activators of the mammalian clock system. *Genes Dev*, 17:1921- 1932.
81. Kondratov RM, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV y Antoch MP. (2006). Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev*, 20(14):1868-1873.
82. Konopka RJ y Benzer S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68(9):2112-2116.
83. Koyanagi S, Okazawa S, Kuramoto Y, Ushijima K, Shimeno H, Soeda S, Okamura H y Ohdo S. (2006). Chronic treatment with prednisolone represses the circadian oscillation of clock gene expression in mouse peripheral tissues. *Mol Endocrinol*, 20(3):573-583.
84. Krieger DT. (1974). Food and water restriction shifts corticosterone, temperature, activity and brain amine periodicity. *Endocrinol*, 95(5):1195-1201.
85. Kwon I, Lee J, Chang SH, Jung NC, Lee BJ, Son GH, Kim K y Lee KH. (2006). BMAL1 shuttling controls transactivation and degradation of the CLOCK/BMAL1 heterodimer. *Mol Cell Biol*, 26:7318-7330.
86. Lamia KA, Storch KF y Weitz CJ. (2008). Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(39):15172-15177.
87. Le Martelot G, Claudel T, Gatfield D, Schaad O, Kornmann B, Sasso GL, Moschetta A y Schibler U. (2009). REV-ERB α participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biol*, 7(9):e1000181.
88. Lee J, Lee Y, Lee MJ, Park E, Kang SH, Chung CH, Lee KH y Kim K. (2008). Dual modification of BMAL1 by SUMO2/3 and ubiquitin promotes circadian activation of the CLOCK/BMAL1 complex. *Mol Cell Biol*, 28:6056-6065.
89. Loh DH, Dragich JM, Kudo T, Schroeder AM, Nakamura TJ, Waschek JA, Block GD y Colwell CS. (2011). Effects of vasoactive intestinal peptide genotype on circadian gene expression in the suprachiasmatic nucleus and peripheral organs. *J Biol Rhythms*, 26(3):200-209.
90. López-Bayghen E, Aguirre A y Ortega A. (2003a). Transcriptional regulation through glutamate receptors: involvement of tyrosine kinases. *J Neurosci Res*, 74(5):717-725.
91. López-Bayghen E, Espinoza-Rojo M y Ortega A. (2003b). Glutamate down-regulates GLAST expression through AMPA receptors in Bergmann glial cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 115(1):1-9.
92. López T, López-Colomé AM y Ortega A. (1994). AMPA/KA receptor expression in radial glia. *Neuroreport*, 5:504-506.
93. López T, López-Colomé AM y Ortega A. (1997). NMDA receptors in cultured radial glia. *FEBS Lett*, 405(2):245-248.

94. MacDonald JF, Martin Wojtowicz J y Baskys A. (1996). Glutamate receptors. En: *Brain mechanisms and psychotropic drugs* (Baskys A, Remington G, eds.). 1ª ed. CRC Press, New York. Págs. 117-130.
95. Madden DR. (2002). The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci*, 3(2): 91-101.
96. Martínez-Lozada Z, Hernández-Kelly LC, Aguilera J, López-Bayghen E y Ortega A. (2011). Signaling through EAAT-1/GLAST in cultured Bergmann glia cells. *Neurochem Int*, 59:871-879.
97. Mary S, Stephan D, Gomeza J, Bockaert J, Pruss RM y Pin JP. (1997). The rat mGluR1d receptor splice variant shares functional properties with the other short isoforms of mGluR1 receptor. *Eur J Pharmacol*, 335:65-72.
98. Mattson MP. (2008). Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1144:97-112.
99. McKenna MC. (2007). The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res*, 85(15):3347-3358.
100. Mendoza J. (2007). Circadian clocks: setting time by food. *J Neuroendocrinol*, 19(2):127-137.
101. Mendoza J, Pévet P, Felder-Schmittbuhl MP, Bailly Y y Challet E. (2010). The cerebellum harbors a circadian oscillator involved in food anticipation. *J Neurosci*, 30:1894-1904.
102. Menna-Barreto L. (1999). Human chronobiology. *Ann Rev Biomed Sci*, 1:103-132.
103. Meyer-Bernstein EL y Morin LP. (1996). Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *J Neurosci*, 16(6):2097-2111.
104. Michaelis EK. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiol*, 54:369-415.
105. Minakami R, Iida K, Hirakawa N y Sugiyama H. (1995). The expression of two splice variants of metabotropic glutamate receptor subtype 5 in the rat brain and neuronal cells during development. *J Neurochem*, 65:1536-1542.
106. Miró E y Buéla-Casal G. (1994). Síndrome del Jet-Lag. *Psicología Conductual*, 2(3):311-322.
107. Moepps B y Fagni L. (2003). Mont Sainte-Odile: a sanctuary for GPCRs. Confidence on signal transduction of G-protein-coupled receptors. *EMBO Rep*, 4(3): 237-243.
108. Moore RY y Eichler VB. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*, 42:201-206.
109. Moore RY y Lenn NJ. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol*, 146(1):1-14.
110. Moore RY, Speh JC y Leak RK. (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res*, 309(1):89-98.
111. Mora F y Sanguinetti AM. (2004). Diccionario de neurociencias. 1ª ed. Alianza editorial, Madrid.
112. Morin LP y Allen CN. (2006). The circadian visual system, 2005. *Brain Res Rev*, 51:1-60.

113. Müller T, Möller T, Berger T, Schnitzer J y Kettenmann H. (1992). Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. *Science*, 256:1563-1566.
114. Namihira M, Honma S, Abe H, Tanahashi Y, Ikeda M y Honma K. (1999). Daily variation and light responsiveness of mammalian clock gene, Clock and BMAL1, transcripts in the pineal body and different areas of brain in rats. *Neurosci Lett*, 267:69-72.
115. Nicholls DG. (1993). The glutamatergic nerve terminal. *Eur J Biochem*, 212:613-631.
116. Norenberg MD y Martínez-Hernández A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res*, 161:303-310.
117. Ohdo S. (2007). Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: chronopharmacological finding on antitumor drugs. *J Pharmacol Sci*, 103(2):155-158.
118. Okamura H, Yamaguchi S y Yagita K. (2002). Review: Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res*, 309:47-56.
119. Ortega A, Eshhar N y Teichberg VI. (1991). Properties of kainate receptor/channels on cultured Bergmann glia. *J Neurosci*, 41(2-3):335-349.
120. Pedersen DB, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL y Zoran MJ. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet*, 6(7):544-556.
121. Peleg L, Zvulunov A y Ashkenazi IE. (1995). Genetic control of biological rhythms: independent expression of each rhythm parameter. *Life Sci*, 56(13):1143-1149.
122. Pin JP, Waeber C, Prezeau L, Bockaert J y Heinemann SF. (1992). Alternative splicing generates metabotropic glutamate receptors inducing different patterns of calcium release in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci*, 89:10331-10335.
123. Pittendrigh CS. (1993). Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol*, 55: 16-54.
124. Pittendrigh CS y Daan S. (1976). A functional analysis of circadian pacemaker in nocturnal rodents. I-V. *J Comp Physiol*, 106(1):223-355.
125. Pocock JM, Cousin MA y Nicholls DG. (1993). The calcium channel coupled to the exocytosis of L-glutamate from cerebellar granule cells is inhibited by the spider toxin, Aga-GI. *Neuropharmacol*, 32(11):1185-1194.
126. Poletini MO, McKee DT, Kennett JE, Doster J y Freeman ME. (2007). Knockdown of clock genes in the suprachiasmatic nucleus blocks prolactin surges and alters FRA expression in the locus coeruleus of female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(5):E1325-1334.
127. Portela A, Northrup G, Halberg F, Cornélissen G, Wendr H, Melby JC y Haus E. (1996). Changes in human blood pressure with season, age and solar cycles: a 26-years record. *Int J Biometeorol*, 39(4):176-181.
128. Preitner N, Damiola F, López-Molina L, Zakany J, Doboule D, Albrecht U y Schibler U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB alpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110(2):251-260.
129. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara J y Williams SM. (2012). Neuroscience. 5ª ed. *Sunderland (MA): Sinauer Associates*. ISBN-10: 0-87893-742-0.
130. Ralph MR, Foster RG, Davis FC y Menaker M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247(4945):975-978.

131. Ramnani N. (2006). The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function. *Nat Rev Neurosci*, 7(7):511-522.
132. Reichenbach A y Wolburg H. (2005). Astrocitos y glía ependimal. En: *Neuroglía* (Kettenmann H y Ransom BR). 2ª ed. Oxford: Oxford University Press, New York. Págs. 19-35.
133. Reppert SM. (2000). Cellular and molecular basis of circadian timing in mammals. *Semin Perinatol*, 24(4):243-246.
134. Reppert SM y Weaver DR. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*, 63:647-676.
135. Richter GH, Torres-Farfán C, Rojas-García PP, Campino C, Torrealba F y Serón-Ferré M. (2004). The circadian timing system: making sense of day/night gene expression. *Biol Res*, 37(1):11-28.
136. Robinson MB. (2006). Acute regulation of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on constitutive and regulated trafficking. *Handb Exp Pharmacol*, 175:251-275.
137. Roenneberg T y Merrow M. (2003). The network of time: understanding the molecular circadian system. *Curr Biol*, 13(5):R198-207.
138. Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Agustín O y De Medina FS. (2010). Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem*, 401:318-320.
139. Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB y Fitzgerald GA. (2004). BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol*, 2:e377.
140. Ruiz M y Ortega A. (1995). Characterization of an Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from cultured Bergmann glia. *Neuroreport*, 6:2041-2044.
141. Rusak B y Bina KG. (1990). Neurotransmitters in the mammalian circadian system. *Annu Rev Neurosci*, 13: 387-401.
142. Sahar S, Zocchi L, Kinoshita C, Borrelli E y Sassone-Corsi P. (2010). Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3beta-mediated phosphorylation. *PLoS ONE*, 5:e8561.
143. Saito N y Shirai Y. (2002). Protein kinase C gamma (PKC gamma): Function of neuron specific isotype. *J Biochem*, 132:683-687.
144. Salgado DRC, Fuentes PB y Escobar BC. (2009). La desincronización interna como promotora de enfermedad y problemas de conducta. *Salud Mental*, 32:69-76.
145. Sanada K, Okano T y Fukada Y. (2002). Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-PAS transcription factor BMAL1. *J Biol Chem*, 277:267-271.
146. Schibler U, Ripperger J y Brown SA. (2003). Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms*, 18(3):250-260.
147. Schoepp DD, Bockaert J y Sladeczek F. (1990). Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 11:508-515.
148. Segall LA y Amir S. (2010). Glucocorticoid regulation of clock gene expression in the mammalian limbic forebrain. *J Mol Neurosci*, 42(2):168-175.
149. Shim HS, Kim H, Lee J, Son GH, Cho S, Oh TH, Kang SH, Seen DS, Lee KH y Kim K. (2007). Rapid activation of CLOCK by Ca²⁺-dependent protein kinase C mediates resetting of the mammalian circadian clock. *EMBO Rep*, 8:366-371.

150. Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y y Menaker M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*, 291(5503):490-493.
151. Stratmann M y Schibler U. (2006). Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. *J Biol Rhythms*, 21(6):494-506.
152. Tamaru T, Hirayama J, Isojima Y, Nagai K, Norioka S, Takamatsu K y Sassone-Corsi P. (2009). CK2alpha phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. *Nat Struct Mol Biol*, 16:446-448.
153. Thomsen C, Pekhletski R, Haldeman B, Gilbert TA, O'Hara P y Hampson DR. (1997). Cloning and characterization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR4b. *Neuropharmacol*, 36:21-30.
154. Toh KL. (2008). Basic science review on circadian rhythm biology and circadian sleep disorders. *Ann Acad Med Singapore*, 37:662-668.
155. Tosini G y Menaker M. (1996). Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science*, 272:419-421.
156. Tsuchiya Y, Akashi M y Nishida E. (2003). Temperature compensation and temperature resetting of circadian rhythms in mammalian cultured fibroblasts. *Genes Cells*, 8(8):713-720.
157. Van den Pol AN. (1993). Glutamate and GABA presence and action in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms*, 8:S11-S15.
158. Vielhaber EL, Duricka D, Ullman KS y Virshup DM. (2001). Nuclear export of mammalian PERIOD proteins. *J Biol Chem*, 276:45921-45927.
159. Virchow R. (1846). U'ber das granulirte ansehn der wandungen der gerhirnventrikel. *Allg Z Psychiatr*, 3:424-450.
160. Westerman AT, Roma PG, Price RC y Dominguez JM. (2010). Assessing the role of the medial preoptic area in ethanol-induced hypothermia. *Neurosci Lett*, 475(1):25-28.
161. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M y Tei H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, 288:682-685.
162. Yan L. (2009). Expression of clock genes in the suprachiasmatic nucleus: efecct of environmental lighting conditions. *Rev Endocr Metab Disord*, 10(4): 301-310.
163. Yang CZ, Zhao R, Dong Y, Chen XQ y Yu AC. (2008). Astrocyte and neuron intone through glutamate. *Neurochem Res*, 33(12):2480-2486.
164. Yi JH y Hazell AS. (2006). Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochem Int*, 48(5):394-403.
165. Zhang L, Abraham D, Lin ST, Oster H, Eichele G, Fu YH y Ptácek LJ. (2012). PKC γ participates in food entrainment by regulating BMAL1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109:20679-20684.
166. Zhang L, Kolaj M y Renaud LP. (2006). Suprachiasmatic nucleus communicates with anterior thalamic paraventricular nucleus neurons via rapid glutamatergic and GABAergic neurotransmission: state-dependent response patterns observed in vitro. *Neurosci*, 141:2059-2066.

13. ANEXOS

13.1 Artículo de divulgación científica

La

ciencia **y el HOMBRE**

NÚMERO **3**

VOLUMEN XXVI

SEPTIEMBRE-DICIEMBRE 2013

ISSN: 0187-8786

**olfatear es
recordar**

**el camino
poético
de la ciencia**

REVISTA DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA



LAS ENFERMEDADES DEL OLFATO

Lizbeth Donají Chi Castañeda*,
Enrique Meza, Mario Caba
y Rossana Citlali Zepeda

* Centro de Investigaciones Biomédicas, UV.
zs10019631@estudiantes.uv.mx

Hay en el perfume una fuerza de persuasión más fuerte que las palabras, el destello de las miradas, los sentimientos y la voluntad. La fuerza de persuasión del perfume no se puede contrarrestar, nos invade como el aire invade nuestros pulmones, nos llena, nos satura, no existe ningún remedio contra ella.

PATRICK SÜSKIND, *El perfume*

Los seres vivos estamos constantemente expuestos a una inmensa cantidad de sustancias que se encuentran en el ambiente y que percibimos gracias al sentido del olfato. A través de él podemos distinguir desde aromas de alimentos suculentos y fragancias de perfumes, hasta olores desagradables. Cuando hay humo en el ambiente percibimos un “olor a quemado”; aun cuando la fuente del fuego no se encuentre cerca de nosotros ni sea accesible a los demás sentidos, como la vista o el tacto, con el olfato podemos ubicar su origen y eliminarlo, o alejarnos del lugar rápidamente. En este sentido, el olfato es indispensable para la supervivencia, pero también para la comuni-

cación interpersonal y el consumo de alimentos y líquidos, es decir, para relacionarnos de manera óptima con nuestro entorno.

El olfato es considerado como un sentido químico, ya que percibimos los olores como consecuencia de la interacción directa de los compuestos químicos con las células del epitelio olfatorio, ubicado dentro de nuestra cavidad nasal. La anatomía del sistema olfatorio es similar en la mayoría de los vertebrados. De manera general, está conformado en el exterior por las narinas, la cavidad nasal y los receptores olfatorios, los cuales comunican el interior del cerebro con el bulbo olfatorio, que a su vez lleva la señal olfativa a través del tracto olfatorio lateral hacia diversas partes del sistema nervioso central para su procesamiento.

La percepción de los olores comienza en las células receptoras olfativas, ubicadas en la parte profunda de la nariz. En los mamíferos se han identificado más de mil proteínas receptoras diferentes que se expresan únicamente en las células receptoras olfatorias, las

cuales son las encargadas de recibir los estímulos odoríferos que provienen del medio ambiente. Sin embargo, cada célula receptora expresa individualmente una o algunas proteínas receptoras confiriéndoles una gran especificidad de recepción del estímulo. Las células que contienen los receptores olfatorios están en el epitelio olfatorio, por lo que se encuentran directamente expuestas a las condiciones ambientales, como temperatura, toxinas, daños físicos, entre otros. Ésta podría ser la razón por la que dichas células se regeneran constantemente, capacidad que disminuye con la edad, deteriorando la sensibilidad a los olores e incrementando la susceptibilidad del sistema olfatorio a las infecciones virales.

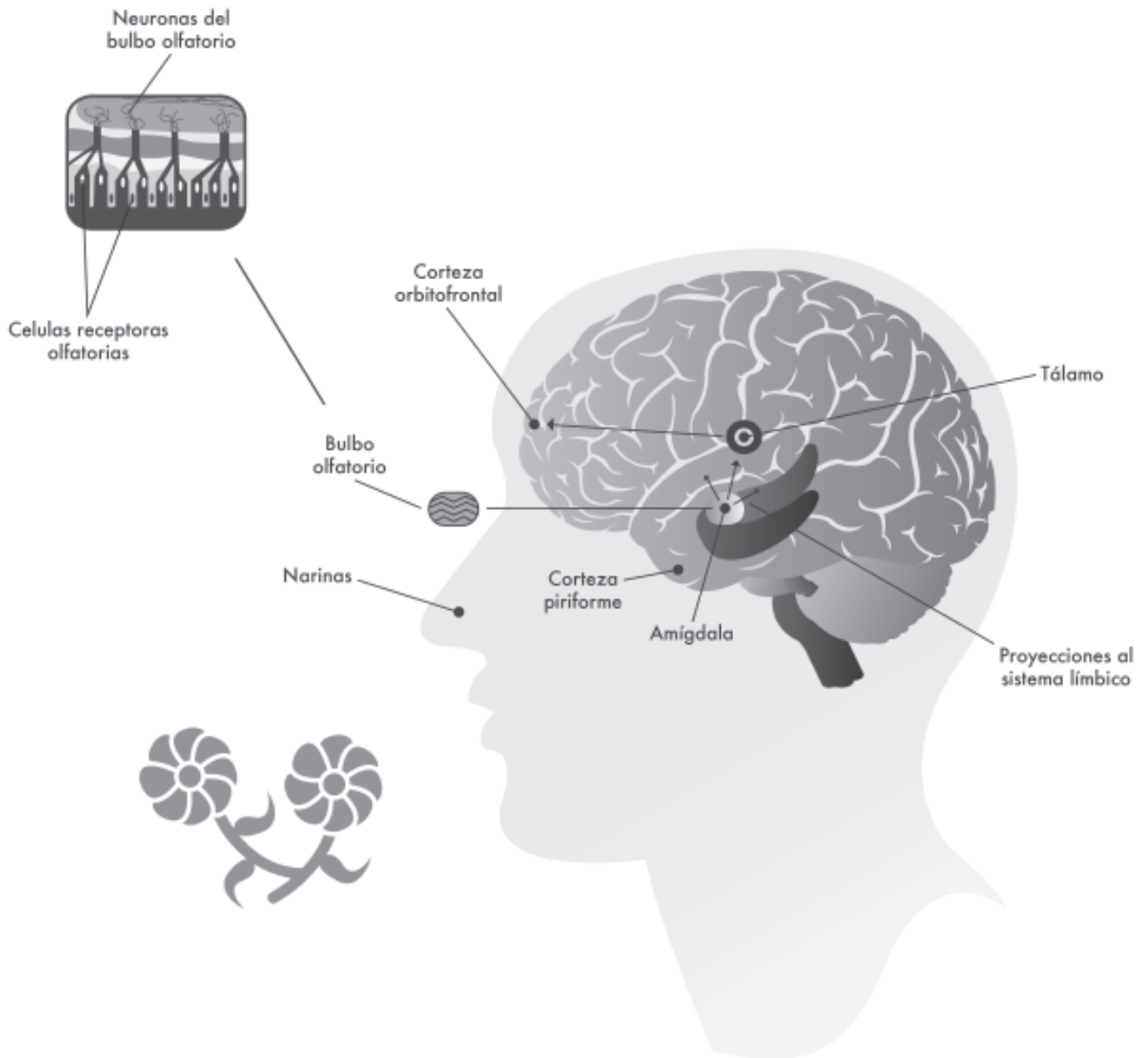
La sensibilidad olfativa, al menos en los humanos, depende de la edad y del género. Las mujeres tienen una capacidad olfativa superior a la de los hombres. La razón exacta se desconoce; sin embargo, se ha especulado que las diferencias hormonales entre ambos sexos podrían ser la causa, debido a que la capacidad olfativa en las mujeres fluctúa durante el ciclo menstrual y el embarazo. Otra explicación es que las mujeres tienen mayor conciencia social respecto del olfato, es decir, muestran más interés que los hombres por los olores como señales sociales; sin embargo, ambas teorías siguen en debate.

La predominancia del sentido del olfato sobre los demás sentidos varía dependiendo de la especie. En el humano, el olfato es el sentido más desarrollado en el momento de nacer y gracias a él somos capaces de reconocer a nuestra madre, de mantener una intercomunicación con ella y de establecer una gran

cantidad de conductas sociales. Aunque con el paso del tiempo la visión adquiere mayor importancia, el olfato sigue siendo uno de los sentidos más importantes en la vida diaria. Aun cuando la capacidad humana de discriminar olores es limitada en relación con otras especies animales, podemos percibir miles de olores diferentes. Por otra parte, el olfato es un sentido que se puede entrenar, como se puede demostrar con los creadores de perfumes, quienes son capaces de diferenciar alrededor de cinco mil fragancias diferentes, mientras que los catadores de vinos pueden identificar alrededor de cien componentes del sabor de un vino con base en combinaciones de sabor y aroma.

Al igual que el resto de los órganos que integran nuestro cuerpo, el olfato también puede enfermar. Las alteraciones en el sentido del olfato son modificaciones en la capacidad de percepción de los estímulos odoríferos. Estas alteraciones pueden dividirse en cuantitativas y cualitativas. Las cuantitativas consisten en la pérdida total (anosmia) o parcial (hiposmia) del olfato y el aumento en la intensidad de la percepción de los olores (hiperosmia). Por su parte las modificaciones cualitativas se refieren a la percepción errónea de un olor generalmente desagradable (parosmia), la percepción equivocada de los olores (disosmia) y la percepción de un olor cuando no existe (fantosmia).

La anosmia y la hiposmia suelen ser los primeros síntomas en pacientes con enfermedades como alzheimer, parkinson y huntington.



El sistema olfatorio está conformado en el exterior por las narinas, la cavidad nasal y los receptores olfatorios, los cuales comunican al interior con el nervio y bulbo olfatorio. Las células del bulbo olfatorio llevan la información odorífera hacia diversas áreas del cerebro especializadas en el procesamiento de los olores. Modificado de Eric R. Kandel, James Harris Schwartz, Thomas M. Jessell. (2001). Principios de Neurociencia. 4ª Edición. McGraw-Hill Interamericana.



La hiposmia es la alteración del olfato más común, mientras que la hiperosmia es muy rara y se asocia principalmente a la exposición a vapores tóxicos y al padecimiento crónico de migrañas. Las mujeres embarazadas presentan por lo general la parosmia, que altera los caracteres de ciertos olores haciéndolos típicamente desagradables y aversivos, lo cual ha sido interpretado como un mecanismo protector de las madres hacia algunos agentes del medio ambiente que podrían dañar a los bebés. La parosmia se asocia también a la reducción de la sensibilidad olfativa que ocurre comúnmente después de infecciones virales de las vías respiratorias altas o

de golpes en la cabeza; en casos muy raros, la parosmia puede ser causada por sinusitis. La fantosmia, por otro lado, es típica en algunas enfermedades psiquiátricas, como la esquizofrenia.

Las alteraciones del olfato pueden tener orígenes muy diversos. Entre las causas más frecuentes de pérdida repentina del olfato se encuentran las infecciones virales o bacterianas, las cuales pueden ser producto del resfriado común; sinusitis paranasal, traumatismos cráneo-encefálicos, inhalación de tóxicos, administración de algunos medicamentos, enfermedades sistémicas como rinitis, hipertensión arterial, o problemas digestivos

como la dispepsia. Existen otras causas menos frecuentes de desórdenes olfativos, como la anosmia congénita, epilepsia, sarcoidosis, lupus eritematoso, hipotiroidismo, diabetes, falla hepática o renal, formación de tumores, e incluso las cirugías estéticas pueden causar pérdida temporal del olfato.

En la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas hay cambios neuropatológicos en ciertas áreas del cerebro asociadas al procesamiento de los olores, por lo que la pérdida del olfato puede ser un importante síntoma temprano para la detección de este tipo de enfermedades. Otros factores asociados a la pérdida del olfato son la edad y el tabaquismo; al aumentar la edad es mayor la posibilidad de pérdida del olfato y menor la probabilidad de recuperación. Además, los fumadores tienen una menor capacidad olfativa —cerca de seis veces menos— en comparación con los no fumadores, dependiendo de la cantidad de cigarrillos fumados y el tiempo de consumo.

El diagnóstico de las alteraciones olfativas inicia con la reconstrucción detallada de la historia clínica de los pacientes, la cual deberá incluir preguntas acerca de sus hábitos sociales y alimenticios (como fumar o ingerir bebidas alcohólicas); también es importante determinar si han sufrido accidentes, se han sometido a cirugías, enfermedades que padecen o han padecido y qué **tipo de medicamentos** están tomando o han tomado con anterioridad. En el caso de los desórdenes cualitativos, es necesario conocer la periodicidad e intensidad con que se presentan los eventos de percepción de olores, además de las consecuencias de estos eventos en la vida

diaria del paciente. Posteriormente se continúa con la exploración física, y de ser necesario pueden emplearse otras técnicas más completas, como endoscopías, tomografías y radiografías, las cuales permiten conocer el origen del problema olfatorio. En algunos casos, la disminución de la capacidad olfativa puede deberse a una obstrucción nasal que bloquea el acceso de las moléculas odorantes al epitelio olfativo. En casos severos, es conveniente acudir a una revisión neurológica,



Medicamentos que pueden generar alteraciones del olfato*

Tipo de medicamento	Algunos ejemplos
Antibióticos	Ampicilina, azitromicina, metronidazol, tetraciclina
Anticonvulsivos	Carbamazepina, fenitoína
Antidepresivos	Clomipramina, doxepina, imipramina
Antihistamínicos y descongestionantes	Clorfeniramina, loratadina
Antihipertensivos y medicamentos cardiacos	Amilorida, captopril, enalapril, propranolol
Agentes antitiroideos	Metimazol, propiltiouracilo
Antiinflamatorios	Colchicina, penicilina, hidrocortisona
Agentes reductores de lípidos	Fluvastatina, lovastatina, pravastatina
Antineoplásicos	Cisplatino, doxorubicina, metotrexato, vincristina
Agentes contra la enfermedad de Parkinson	Levodopa
Antipsicóticos	Clozapina, trifluoperazina
Relajantes musculares	Baclofén, dantroleno

*Se ha reportado que estos medicamentos alteran la percepción olfativa, sin embargo, cada persona responde de manera diferente a ellos; debido a esto, se recomienda consultar al médico en caso de molestias durante el tratamiento. Tomado de Hummel, Landis BN, Hüttenbrink KB (2011) "Smell and taste disorders". GMS Current Topics in Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery" 10:Doc04

ya que, como se mencionó anteriormente, la anosmia y la hiposmia suelen ser un síntoma temprano de enfermedades neurodegenerativas.

El tratamiento de la disfunción olfativa dependerá de la causa que ocasiona el trastorno. En aquellos pacientes cuyas causas de pérdida del olfato son las enfermedades respiratorias transitorias o el traumatismo, la recuperación ocurre de manera espontánea, pero el tiempo de duración es diferente para cada paciente. Algunos pacientes se recuperan al realizar cambios en los medicamentos que afectan el sentido del olfato, y otros cuando se resuelve la enfermedad que genera el problema. La mayoría de las personas menores de 60 años se recupera rápidamente debido a la gran capacidad de regeneración de las células olfativas; sin embargo, las personas de edad más avanzada pueden tener una recuperación lenta e incluso parcial. En pacientes con disfunción olfativa causada por enfermedad renal crónica se observa mejoría desde la primera hemodiálisis. Existen además otras terapias que utilizan antiinflamatorios esteroidales e incluso, de ser necesario, tratamiento quirúrgico.

Cada año se reportan alrededor de 200 mil casos de alteraciones del olfato en todo el mundo, y aproximadamente en 25% de ellos disminuye la calidad de vida de quienes las padecen debido a que tienen problemas para cocinar, falta de apetito y bajo interés por la comida; además, demuestran problemas para socializar en su vida cotidiana y pueden llegar a deprimirse.

Aunque los problemas del olfato en la población tienen mayor prevalencia de lo que aparentan, no han sido estudiados en la clínica con igual profundidad que como se ha hecho con las alteraciones en otros órganos de los sentidos. Sin embargo, los estudios clínicos y epidemiológicos son suficientes para abordar el problema y tomar las medidas necesarias que permitan establecer métodos de diagnóstico, tratamiento y prevención de estas enfermedades.

LECTOR INTERESADO

Ackerman BH, Kasbekar N (1997) "Disturbances of taste and smell induced by drugs". *Pharmacotherapy*, 17: 482-496.

Croy I, Negoias S, Novakova L, Landis BN, Hummel T (2012) "Learning about the functions of the olfactory system from people without a sense of smell". *PLoS One*, 7(3):e33365.

Hummel, Landis BN, Hüttenbrink KB (2011) "Smell and taste disorders. *GMS Current Topics in Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery*". 10:Doc04

Hüttenbrink KB, Hummel T, Berg D, Gasser T, Hähner A (2013) "Olfactory dysfunction: common in later life and early warning of neurodegenerative disease". *Deutsches Arzteblatt International*, 110(1-2):1-7.

Artículo recibido el 1 de junio de 2012.
Aceptado el 26 de diciembre de 2012.

13.2 Artículo científico

Glutamate-Dependent BMAL1 Regulation in Cultured Bergmann Glia Cells

Donají Chi-Castañeda · Stefan M. Waliszewski ·
Rossana C. Zepeda · Luisa C. R. Hernández-Kelly ·
Mario Caba · Arturo Ortega

Received: 17 December 2014 / Revised: 25 February 2015 / Accepted: 2 March 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Glutamate, the major excitatory amino acid, activates a wide variety of signal transduction cascades. This neurotransmitter is involved in photic entrainment of circadian rhythms, which regulate physiological and behavioral functions. The circadian clock in vertebrates is based on a transcription-translation feedback loop in which Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-like protein 1 (BMAL1) acts as transcriptional activator of others clock genes. This protein is expressed in nearly all suprachiasmatic nucleus neurons, as well as in the granular layer of the cerebellum. In this context, we decided to investigate the role of glutamate in the molecular mechanisms involved in the processes of transcription/translation of BMAL1 protein. To this end, primary cultures of chick cerebellar Bergmann glial cells were stimulated with glutamatergic ligands and we found that BMAL1 levels increased in a dose- and time dependent manner. Additionally, we studied the phosphorylation of serine residues in BMAL1 under glutamate stimulation

and we were able to detect an increase in the phosphorylation of this protein. The increased expression of BMAL1 is most probably the result of a stabilization of the protein after it has been phosphorylated by the cyclic AMP-dependent protein kinase and/or the Ca^{2+} /diacylglycerol dependent protein kinase. The present results strongly suggest that glutamate participates in regulating BMAL1 in glial cells and that these cells might prove to be important in the control of circadian rhythms in the cerebellum.

Keywords Glutamate receptors · Bergmann glia · Clock genes

Abbreviations

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoaxazolepropionate
BGC	Bergmann glia cells
Bmal1	Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-like protein 1
EAAT	Excitatory amino acid transporter
GLAST	Glutamate-aspartate transporter
Glu	Glutamate
KA	Kainate
KB-R7943	2-[2-[4-(4-Nitrobenzyloxy)phenyl]ethyl]isothiourea mesylate
NMDA	N-methyl-D-aspartate

D. Chi-Castañeda
Doctorado en Ciencias Biomédicas, CIB, Universidad Veracruzana, Apartado Postal 91-190, Xalapa, Veracruz, Mexico

D. Chi-Castañeda · L. C. R. Hernández-Kelly · A. Ortega (✉)
Laboratorio de Neurotoxicología, Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), Apartado Postal 14-740, 07000 Mexico DF, Mexico
e-mail: arortega@cinvestav.mx

S. M. Waliszewski
Instituto de Medicina Forense, Universidad Veracruzana, Apartado Postal 94-290, Boca Del Río, Veracruz, Mexico

S. M. Waliszewski · R. C. Zepeda · M. Caba
Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana, Apartado Postal 91-190, Xalapa, Veracruz, Mexico

Introduction

L-Glutamate (Glu) is the major excitatory neurotransmitter in the vertebrate central nervous system (CNS). It is present

in virtually all areas of the brain, its receptors are widely distributed and expressed in the majority of the cells in the brain. This neurotransmitter exerts its actions through the activation of two main subtypes of receptors classified according to their structure and signalling into: ionotropic (iGluRs) and metabotropic receptors (mGluRs). According to their pharmacological and molecular properties, iGluRs are divided into N-methyl-D-aspartate (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoaxazolepropionate (AMPA) and kainate (KA) receptors [20]. Based on sequence homology, pharmacology and signal transduction mechanisms, mGluRs are categorized into three groups. Group I receptors are coupled to stimulation of phospholipase C with the consequent release of intracellular Ca^{2+} , while Groups II and III are coupled to inhibition of adenylate cyclase. These three groups are activated by specific agonists, (RS)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) acts upon Group I, (S)-4-carboxy-3-hydroxyphenylglycine ((S)-4C3HPG) activates Group II, while L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid (L-AP4) is selective for Group III [9].

Removal of the excitatory amino acid from the synaptic cleft is carried out by a family of sodium-dependent Glu transporters [10]. To date, five subtypes of Glu transporters have been characterized, known as excitatory amino acid transporters (EAAT-1 to 5). These EAATs have a different pattern of distribution and kinetic properties in different regions of the brain. It is known that more than 80 % of the total brain removal of Glu from the synaptic cleft, is carried out by EAAT1 or GLAST (Glu/aspartate transporter) and/or EAAT2 or Glt-1 (Glu transporter 1) [30]. Within the cerebellum, the bulk of the Glu uptake takes place in Bergmann glia cells (BGC), which express GLAST [42].

BGC span the entire cerebellar molecular layer in vertebrates, their soma is aligned within the Purkinje cell layer, in fact these cells cover completely excitatory and inhibitory synapses [48]. BGC are involved in neurotransmitter uptake and turnover, K^+ homeostasis, lactate supply and pH regulation due to the expression of a set of receptors and transporters [32]. In language of glutamatergic transmission, BGC are in a very neighbouring proximity to the parallel fiber-Purkinje cell synapses, and participate in the Glu/glutamine shuttle that assures Glu supply to the presynaptic terminals. In this sense, BGC respond to glutamatergic stimulation, as we have been able to characterize over the years [2]. Because of it, it has become an excellent model in which the role of glia cells as partners of neurons can be documented.

Glu is involved in photic entrainment of circadian rhythms, which regulate physiological and behavioral functions, are synchronized to 24-h day period and are found in every kingdom of life [31] and are generated endogenously through genetic control [26]. In vertebrates, the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus is

the master clock that drives the circadian system to synchronize multiple peripheral clocks, which function in the variety of tissues, presumably through combination of neural and humoral signaling [8, 46, 49]. At the molecular level, circadian rhythms are regulated by the so-called “clock genes” that oscillate in a circadian manner [11, 40, 51]. The proteins products of clock genes are transcription factors that control their own and *clock-controlled genes* transcription. One of the clock genes, *bm11*, is a positive component of the handle of the machinery of the circadian system [21]. It is known that defects in this gene, results in loss of circadian rhythms [4], impaired glucose homeostasis [41], infertility [24], altered sleep pattern [29], increased sensitivity to chemotherapy and radiation [16], among others. Furthermore, in the SCN, *bm11* is an intracellular regulator for the generation of circadian Ca^{2+} rhythms [22]. Nowadays, the clock genes discovery has enabled the identification of brain areas that express the molecular machinery necessary for the generation of circadian rhythms. Accordingly, daily oscillations in gene expression of the clock genes have been identified in several regions of the brain [6, 13], including amygdala, olfactory bulb, lateral habenula, a variety of nuclei in the hypothalamus [17], and interestingly cerebellum [1, 38]. Within this structure, Namihira and colleagues reported patterns of expression of *clock* and *bm11* genes which are differentially expressed. Furthermore, the cerebellum is been proposed as a peripheral oscillator, which can be desynchronized of SCN by food [35]. Purkinje cells play an important role in the generation of cerebellar circadian rhythms, whether glial cells participate in the generation of this rhythms is unknown.

Glu is the most prevalent excitatory neurotransmitter in the CNS [25] and glial cells are essential regulators of the formation, maintenance and function of glutamatergic synapses [25]. The molecular mechanisms involved in BMAL1 regulation are far from been established, and no role for Glu has been documented either in neurons or glia cells. As a step forward in the characterization of the regulation of such an important transcription factor, we demonstrate here using the established model of cultured cerebellar BGC, Glu participates in the regulation of BMAL1 protein levels in glia cells through the activation of its receptors and transporters.

Materials and Methods

Animals

Chick embryos (10 days old) were obtained from Avi-Mex and maintained at 37 °C until used. All experiments were performed according to International Guidelines on the

Ethical Use of Animals and had the specific approval of the Animal Ethics Committee of Cinvestav-Mexico. All efforts were made to reduce the number of embryos used and their suffering.

Materials

Tissue culture reagents were obtained from GE Healthcare (Carlsbad, CA, USA). A23187 (5-(methylamino)-2-((2R,3R,6S,8S,9R, 11R)-3,9,11-trimethyl-8-[(1S)-1-methyl-2-oxo-2-(1H-pyrrol-2-yl) ethyl]-1,7-dioxaspiro[5.5] undec-2-yl)methyl)-1,3-benzoxazole-4- carboxylic acid), KB-R7943 (2-[2-[4-(4-Nitrobenzyloxy) phenyl] ethyl] isothiourea-mesylate), DHPG ((RS)-3,5-dihydroxyphenilglycine), AMPA, NMDA, THA (Threo-b-hydroxyaspartate), DNQX (6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione), L-AP4 (L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid), CPCCOEt (7-(Hydroxyimino)-cyclopropa-[b]-chromen-1a-carboxylate ethyl ester), Asp (D-aspartate) and L-Glu were all obtained from Tocris-Cookson (St. Louis, MO, USA). KA was obtained from Ocean Produce International (Shelburne, Nova Scotia, Canada). Polyclonal anti-BMAL1 was purchased from Santa Cruz Biotech., (Santa Cruz, CA, USA; E-19: sc-8614). Horseradish peroxidase-linked anti-rabbit antibodies, and the enhanced chemiluminescence reagent (ECL), were obtained from Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). All other chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Cell Culture and Stimulation Protocol

Primary cultures of cerebellar BGC were prepared from 14-day-old chick embryos as previously described [39]. Cells were plated in 6-well plastic culture dishes in DMEM containing 10 % fetal bovine serum, 2 mM glutamine, and gentamicin (50 µg/mL) and used on the fourth–seventh days after culture. Before any treatment, confluent monolayers were washed twice to remove all non-adhering cells with assay buffer (25 mM HEPES, 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl₂·6H₂O, 33.3 mM glucose, 1 mM Na₂HPO₄ and 1.8 mM CaCl₂ at pH 7.4) and then treated as indicated. Inhibitors were added 30 min before agonists. The cells were treated with Glu analogues added to culture medium for the indicated time periods.

SDS-PAGE and Western Blots

Cells from confluent monolayers were harvested with phosphate-buffer saline (PBS) (10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.4) containing phosphatase inhibitors (10 mM NaF, 1 mM Na₂MoO₄ and 1 mM Na₃VO₄). The cells were lysed for the extraction of nuclear proteins with buffer A (1 M HEPES, pH 7.9; 1 M KCl, 50 mM EDTA,

10 mM EGTA, 100 mM DTT, 100 mM PMSF, 1 mg/mL aprotinin and 1 mg/mL leupeptin) and buffer B (1 M HEPES, pH 7.9; 4 M NaCl, 50 mM EDTA, 10 mM EGTA, 100 mM DTT and 50 µL/mL complete). Cell lysates were denaturalized in Laemmli's sample buffer, and equal amount of protein (50 µg as determined by the Bradford method) were resolved through 10 % SDS-PAGE and then electroblotted to nitrocellulose membranes. Blots were stained with Ponceau S stain to confirm that protein content was equal in all lanes. Membranes were soaked in PBS to remove the Ponceau S and incubated in TBS containing 5 % dried skimmed milk and 0.1 % Tween 20 for 2 h to block the excess of non-specific protein binding sites. Membranes were then incubated overnight at 4 °C with the particular primary antibody, BMAL1, followed by secondary antibody. Immunoreactive polypeptides were detected by chemiluminescence and exposed to X-ray films. Densitometry analyses were performed and data analyzed with Prism, GraphPad Software (San Diego, CA, USA).

Immunoprecipitation

Cells lysates were pre-absorbed with 3 µL of G protein coupled agarose for 4 h at 4 °C. The cleared lysates (1 mg of protein) were incubated with anti BMAL1 antibody overnight, 4 °C and then immunoblotted as described above.

Statistical Analysis

Data are expressed as the mean (average) ± standard error mean (SEM). One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to determine significant differences between conditions. When this analysis indicated significance (at the 0.05 level), post hoc Student–Newman–Keuls test analysis was used to determine which conditions were significantly different from each other with the Prism, GraphPad Software (San Diego, CA, USA).

Results

BMAL1 is Expressed in Bergmann Glia Cells

BMAL1 is a clock protein that forms the core of the circadian molecular machinery. It is needed to generate a proper circadian gene expression pattern, and by these means controls almost all the functions of an organism. Accordingly, we asked ourselves whether this protein is present in glia cells and if so, would it be modulated by the major excitatory amino acid in the vertebrate brain. Using the system of chick cerebellar Bergmann glia cultures, we could detect the characteristic 69 kDa band (Fig. 1). We

then decided to study the role of Glu in the expression of BMAL1 in BGC cultures. As a first approach, we exposed confluent BGC monolayers to 1 mM Glu for 30 min and a significant increase in the expression of BMAL1 was found (Fig. 1a). Because of the variability of the detection levels of actin to normalize the results of each experiment, we decided to normalize all subsequent blots with the Ponceau S staining (1b).

To further characterize the Glu effect, we established the time dependence of BMAL1 increase. To this end, we performed treatments of BGC with 1 mM Glu for 3, 6 and 12 h. A 6 h Glu treatment is sufficient to increase the expression of this protein (Fig. 2a), therefore, all subsequent experiments were done after 6 h of glutamatergic stimulation. To establish a physiological relevance of this expression, we treated BGC cultures with increasing Glu concentrations, and as can be seen in panel b of Fig. 2, a clear dose-dependency could be established with an EC_{50} of 451 μ M, suggesting a receptor-mediated effect (Fig. 2c). However, as has been reported, the concentration of Glu in the synaptic cleft has been estimated to be in the low millimolar range [10]; therefore subsequent experiments were performed with a concentration 1 mM Glu.

Pharmacological Characterization of Glu-dependent Increase in BMAL1

Through the use of pharmacological tools, the profile of the Glu response was determined. Confluent BGC monolayers were exposed to different concentrations of the specific ionotropic receptor agonists 250 μ M KA, 500 μ M AMPA or NMDA plus glycine (10 μ M), a 25 μ M concentration of the group I metabotropic receptor agonist DHPG or 500 μ M concentration of the group III mGluRs agonist

L-AP4 for 6 h. As shown in panel a of Fig. 3, the iGluRs agonist AMPA, as well as the group I mGluRs agonist DHPG augments BMAL1 expression in BGC cultures. Neither, KA, NMDA nor L-AP4 were capable to mimic the Glu effect (Fig. 3a).

To evaluate the ionotropic and metabotropic contribution to Glu response, we took advantage of specific Glu receptor antagonists. BGC cultures were treated for 30 min with 50 μ M DNQX (an AMPA receptors antagonist) or 100 μ M CPCCOEt (a metabotropic Glu receptors antagonist of group I) prior to a 1 mM Glu or 25 μ M DHPG stimulation for 6 h; the results are presented in Fig. 3b and c. As expected, both antagonists, DNQX and CPCCOEt were capable to completely reduce the Glu and DHPG response, suggesting the involvement of AMPA and metabotropic Glu (group I) receptors in the Glu effect (Fig. 3 panels b, c). Taking into consideration that Glu transporters have been described as signal transducers [34], we exposed BGC cultures to a 1 mM concentration of D-aspartate and to the transportable inhibitor THA. The results are presented in Fig. 3 (panel d). Although a discrete increase in BMAL1 is present upon D-aspartate, the fact that THA could not reproduce this response effect suggest that Na^+ influx through the transporter is not necessary for the Glu-dependent increase in BMAL1 expression.

Next, we decided to explore if the Na^+/Ca^{2+} exchanger is involved in Glu-dependent BMAL expression. Confluent BGC monolayers were incubated for 30 min with 15 μ M 2-[2-[4-(4-Nitrobenzyloxy)phenyl]ethyl]isothiourea mesylate (KB-R7943, a blocker of the Na^+/Ca^{2+} exchanger) prior to 1 mM Glu or 10 μ M A23187 (a Ca^{2+} ionophore) stimulation for 6 h. The results shown in Fig. 3 indicate that the selective Na^+/Ca^{2+} exchanger blocker KB-R7943, completely abolished the Glu response. These results suggest that the co-transport of Glu and Na^+ leads to the activation of the Na^+/Ca^{2+} exchanger. In summary, Glu-dependent BMAL1 expression is mediated through ionotropic (AMPA) and metabotropic (group I) Glu receptors. Furthermore, the Na^+/Ca^{2+} exchanger is also involved in the expression of this clock protein.

At this stage, it was important to establish if the Glu effect was the result of an increase in BMAL1 synthesis or, if it was due to an increase in BMAL1 half-life time. Therefore, BGC cultures were treated with 100 μ g/mL cycloheximide (CHX) for 30 min to block de novo protein synthesis before a 1 mM Glu treatment for 15, 30, 60 and 120 min and BMAL1 levels were determined (Fig. 4a). The results obtained provide us information on the likely involvement of Glu in regulating BMAL1. Therefore, we decided to evaluate the effect of each stimulus, separately, on the expression of BMAL1 considering the time where Glu-dependent effect is presented (6 h). To this end, BGC cultures were pre-exposed for the indicated time periods

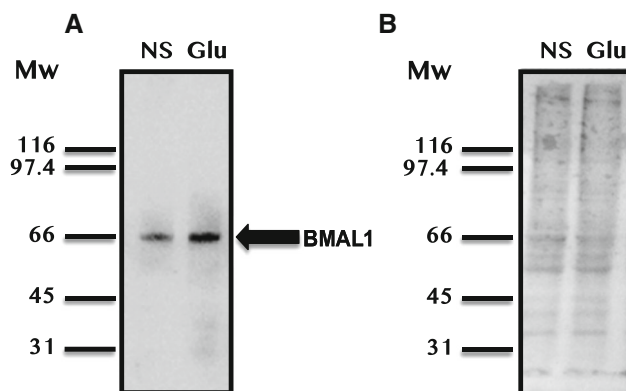


Fig. 1 BMAL1 is expressed in Bergmann Glia Cells. BGC monolayers were treated with vehicle (NS) or 1 mM Glu for 30 min. Levels of BMAL1 expression were detected via Western blots with anti-BMAL1 antibody (a) and were normalized with to Ponceau S staining (b). An autoradiography of a typical experiment is shown

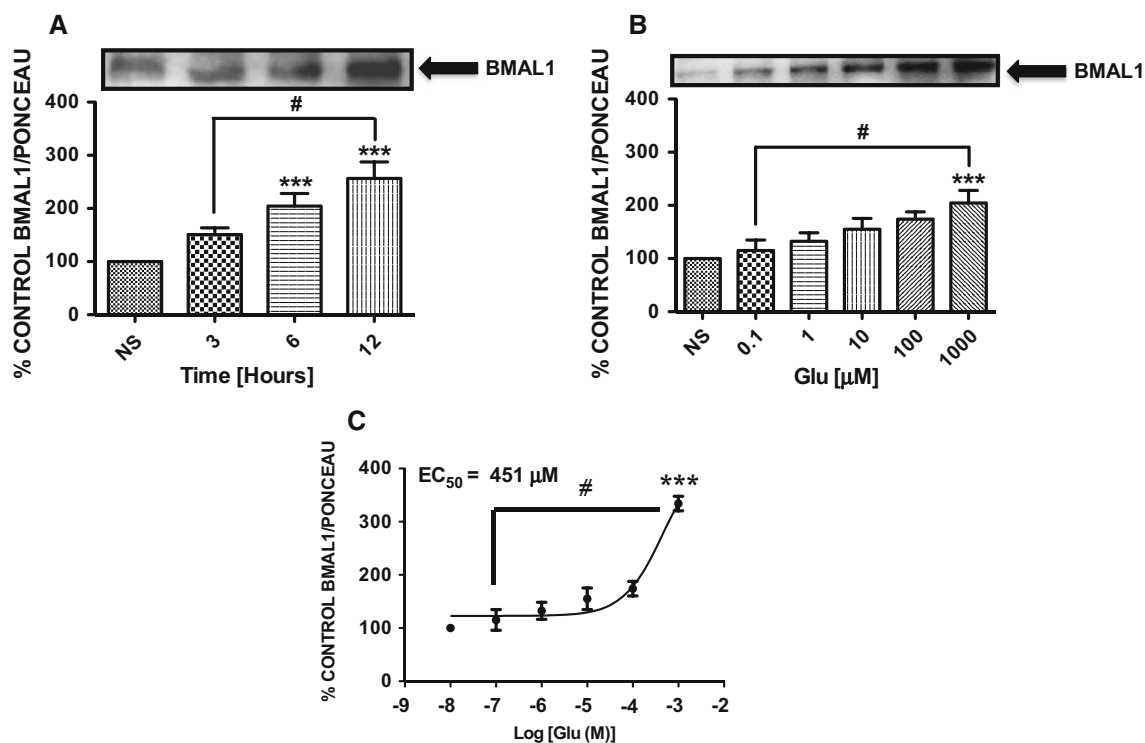


Fig. 2 BMAL1 expression is Glu time- and dose-dependent. **a** BGC monolayers were treated with vehicle (NS) or 1 mM Glu for different time periods. **b** BGC monolayers were treated with vehicle (NS) or increasing Glu concentrations for 6 h. Levels of BMAL1 expression were detected as described in Fig. 1. **c** Nonlinear regression of the incubation with increased Glu concentrations for 6 h. Data are expressed as mean \pm SEM from at least three independent

experiments. An autoradiography of a typical experiment is shown. One-way ANOVA was performed comparing against data obtained from non-stimulated (NS) cells ($***P < 0.001$). In panels a and b a Newman–Keuls Multiple Comparison Test was performed to analyze the effect of Glu at different time periods and with different Glu concentrations, respectively ($\#P < 0.05$)

(0, 1.5, 3 and 6 h) with 1 mM Glu, 100 μ g/mL CHX or 1 mM Glu plus 100 μ g/mL CHX. These data were indicative of an increase in BMAL1 half-life time since CHX treatment was not capable to decrease the levels of BMAL1 when the Glu stimulus was present or not, suggesting that Glu is likely to be regulating BMAL1 stability (Fig. 4b).

BMAL1 Expression is Regulated Through PKA and PKC

Zhang et al. [52] reported that the Ca^{2+} /diacylglycerol-dependent protein kinase (PKC) facilitates ubiquitin cleavage and prevents the formation of polyubiquitinated chains on BMAL1, which then leads to a stabilization of BMAL1. Based on these data, we decided to analyze if in our culture system of BGC, BMAL1 protein is phosphorylated by PKC leading to BMAL1 stabilization. To this end, we performed immunoprecipitation assays coupled to Western blot identification (Fig. 5a). The blots presented in Fig. 5b show that immunoprecipitation of BGC lysates with anti-phosphoserine (P_{Ser}) antibodies and Western blot

analysis with anti-BMAL1 antibodies enabled us to appreciate that BMAL1 is serine phosphorylated under 1 mM Glu. Interestingly, exposure of the cultured cells to 500 nM dibutyryl-cAMP (dbcAMP), a PKA activator, or 100 nM of the diacylglycerol analogue tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) for 6 h results in an increase in BMAL1 levels similarly to the described effect of Glu (Fig. 5c).

Discussion

Glu is the major excitatory amino acid in the vertebrate CNS, which activates a wide variety of signal transduction cascades. Several lines of evidence suggest that Glu is the main photic signal for the circadian clock. Moreover, it has been shown that Glu can also play a role in SCN output to other hypothalamic structures, suggesting that this neurotransmitter might be a signaling molecule of suprachiasmatic cells [53]. Interestingly, Glu can also be synthesized in SCN glia or neurons and is recycled through the glutamate/glutamine cycle [18, 36]. On the other hand, it is

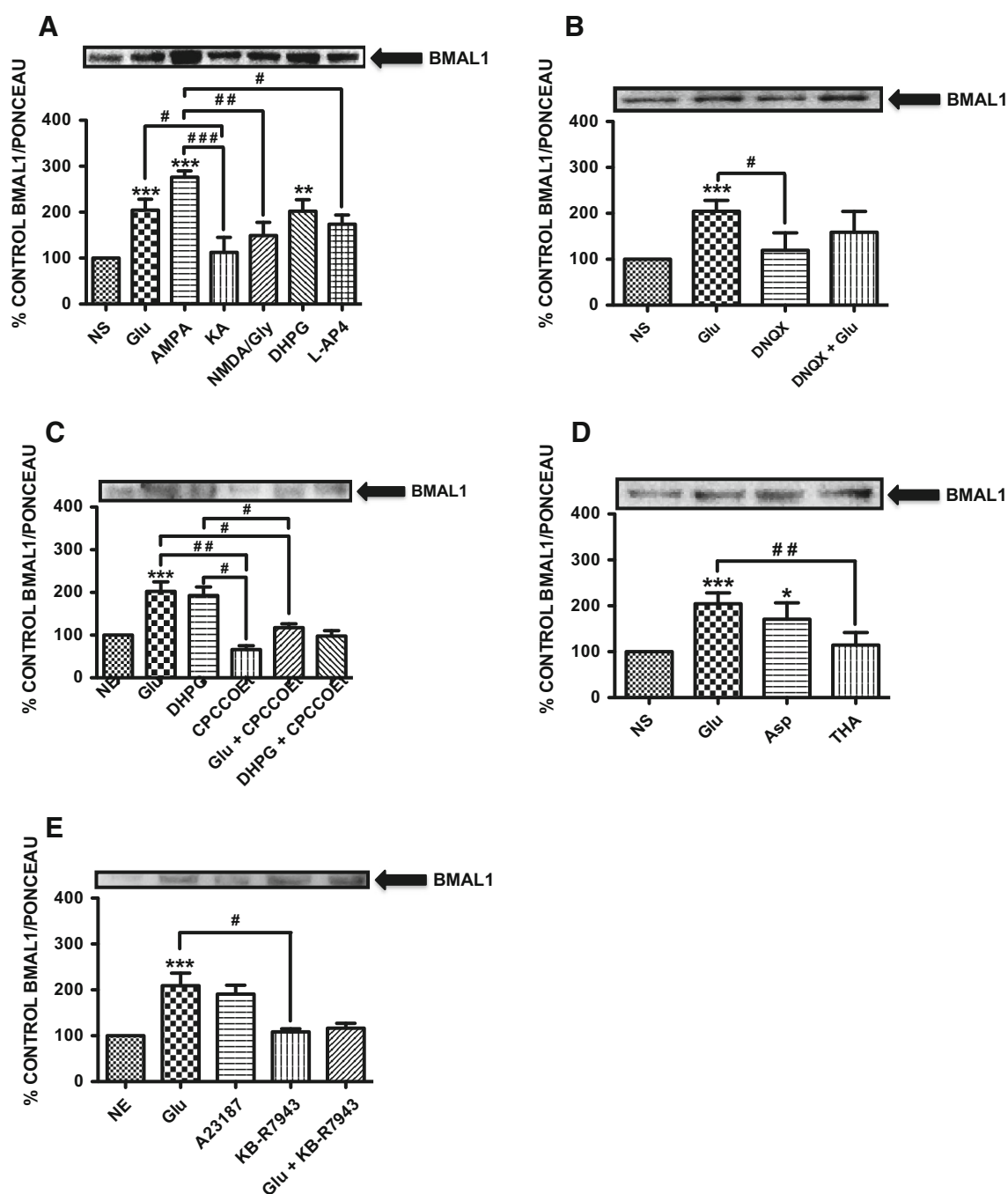


Fig. 3 Pharmacological profile of Glu-induced BMAL1 expression. **a** BGC monolayers were treated for 6 h with vehicle (NS), 1 mM Glu or the indicated Glu agonists; 500 μ M AMPA, 250 μ M KA, 500 μ M NMDA plus 10 μ M Gly, 25 μ M DHPG and 500 μ M L-AP4. **b** BGC monolayers were incubated for 30 min with 50 μ M DNOX (AMPA receptor antagonist) before the 1 mM Glu treatment for 6 h. **c** BGC monolayers were incubated with the metabotropic Glu receptors antagonist of group I CPCCOEt (100 μ M) for 30 min before 1 mM Glu or 25 μ M DHPG exposure (6 h). **d** BGC monolayers were incubated with vehicle (NS), 1 mM Glu, 1 mM aspartic acid (Asp), or the Glu transporter blocker, 100 μ M THA for 6 h. **e** BGC monolayers were pre-exposed for 30 min with 15 μ M KB-R7943 (a blocker of the

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger) and then to 1 mM Glu or 10 μ M A23187 (Ca^{2+} ionophore) for 6 h. Levels of BMAL1 expression were detected as described in Fig. 1. Data are expressed as mean \pm SEM from at least three independent experiments. An autoradiography of a typical experiment is shown. One-way ANOVA was performed comparing against data obtained from non-stimulated (NS) cells (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001). In all five panels Newman-Keuls Multiple Comparison Test was performed to analyze AMPA effect, Glu antagonists effect, DHPG effect, Glu transporter blocker effect and blocker of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger effect, respectively (# P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001)

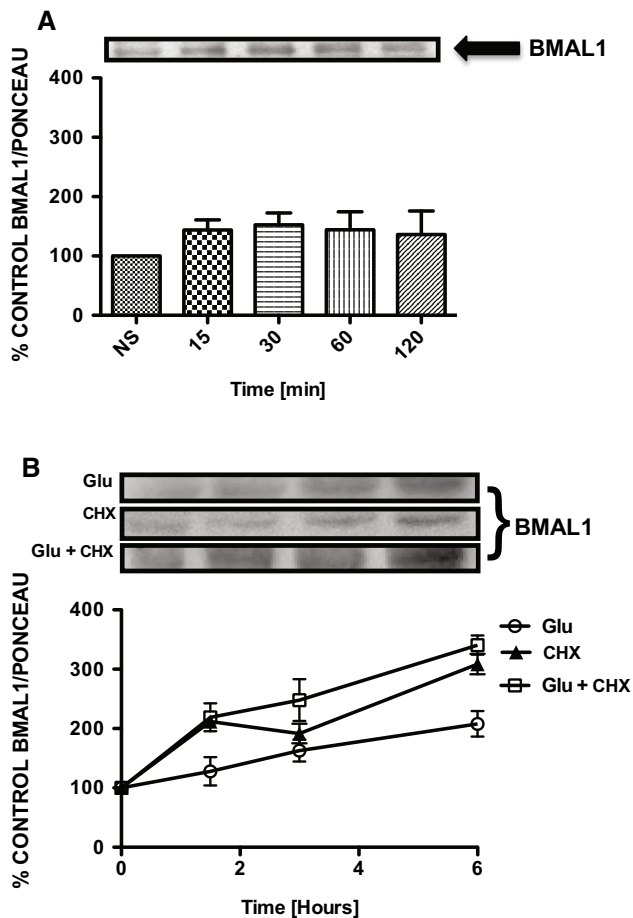


Fig. 4 Glu stabilizes to BMAL1 protein. **a** BGC monolayers were incubated for 30 min with 100 µg/mL CHX before the 1 mM Glu treatments in the indicated time periods. **b** BGC monolayers were incubated with 1 mM Glu (white circles), 100 µg/mL CHX (white squares) or 1 mM Glu plus 100 µg/mL CHX (black triangles) in the indicated time periods. Levels of BMAL1 expression were detected as described in Fig. 1. Data are expressed as mean ± SEM from at least three independent experiments. An autoradiography of a typical experiment is shown. One-way ANOVA was performed comparing against data obtained from non-stimulated (NS or 0 h) cells

noteworthy that although Glu uptake is not regulated in glia in a circadian manner, is known it is modulated by clock gene expression [3].

The role of Glu as a transmitter at retinohypothalamic tract (RHT)/SCN synaptic connections is important and critical for the mediating photic regulation of circadian rhythmicity. In 1993, Castel and colleagues demonstrated that RHT terminals innervating the SCN show Glu immunoreactivity associated with synaptic vesicles, which confirms the role of Glu as a neurotransmitter in the SCN. Since then, different types of Glu receptors were identified and localized in the SCN [15].

As in SCN cells, BGC also express different subtypes of Glu receptors. In our study, the increase in BMAL1 expression is due to the interaction of Glu with AMPA

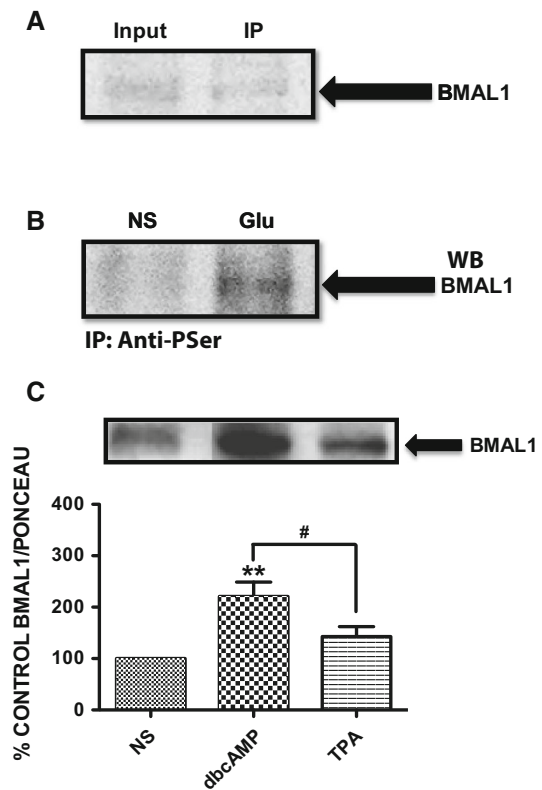


Fig. 5 Protein kinases A and C participate in the regulation of BMAL1 expression. **a** BGC monolayers were immunoprecipitated with anti-phosphoserine antibodies and the immunoprecipitation assay was analyzed by Western blot with anti-BMAL1 antibodies. **b** BGC monolayers were exposed to vehicle (NS) or 1 mM Glu. Total extracts were immunoprecipitated with anti-phosphoserine and then subjected to Western blot analysis with anti-BMAL1 antibodies. **c** BGC monolayers were treated for 6 h with vehicle (NS), 500 µM db-cAMP or 100 nM TPA. Levels of BMAL1 expression were detected as described in Fig. 1. Data are expressed as mean ± SEM from at least three independent experiments. An autoradiography of a typical experiment is shown. One-way ANOVA was performed comparing against data obtained from non-stimulated (NS) cells (***P* < 0.01). In panel c a Newman-Keuls Multiple Comparison Test was performed to analyze db-cAMP effect versus TPA effect (#*P* < 0.05)

receptors, which in these cells are basically composed of GRIA1, GRIA3 and GRIA4 and thus Ca²⁺-permeable [33, 37]; and also to the interaction of Glu with group I mGluRs, which are coupled to phosphatidylinositol metabolism and the release of the Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum. In contrast, NMDA receptors appear not related to the regulation of BMAL1 levels in BGC; however, the Na⁺/Ca²⁺ exchanger seems to be involved in the expression of this clock protein in these cells. A discrete effect was detected upon BGC treatment with Glu transporters ligands (Fig. 3). Whether the signaling mechanisms used by Glu receptors and transporters to stabilize BMAL1 are the same, is not known at the moment but one can

speculate that an increase in intracellular Ca^{2+} levels, triggers a series of events that augment BMAL1 [34].

Clock proteins are necessary for the generation and regulation of circadian rhythms within individual cells throughout the organism. These rhythms influence nearly all aspects of physiology and behavior, including rest-wake cycle, hormone secretion, body temperature and metabolism. For example disruption of BMAL1 results in infertility [24], loss of circadian rhythms [27], defective glucose homeostasis [41], among other dysfunctions.

It has been shown that control of circadian clock components operates not only at the post-transcriptional level [7], but also at the level of protein stability [43]. Interestingly, post-translational modifications of clock proteins are important for ensuring the maintenance of circadian rhythms, as they can modulate the activity and turnover of major clock components [14]. In particular, BMAL1 is a critical regulator of the circadian clock, which undergoes various post-translational modifications, including phosphorylation [12, 43, 45, 50], acetylation [19], sumoylation [5] and ubiquitination [28].

Of particular interest, is known that BMAL1 phosphorylation by distinct kinases appears to regulate its unique

activities [28] and can be a common mode of regulation. Specially, it has been reported that phosphorylation by Casein Kinase I ϵ (CKI ϵ) activates BMAL1-mediated transcription [12], while phosphorylation by Mitogen-activated Protein Kinases (MAPKs) inhibits it [45]. BMAL1 is also targeted by other kinases, for example by Casein Kinase 2 α (CK2 α), which is involved in BMAL1 intracellular localization [50]; and Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β), which controls stability and activity of BMAL1 [43]. However, the phosphorylation status of several of these residues changes in a time-specific manner and regulates period length [14]. All these post-translational modifications, make BMAL1 a highly stable protein, with a half-life time is probably higher than 12 h (Fig. 4), which is higher than the to the half-life time of other clock proteins [17]. Accordingly, the mammalian PKC family is involved in phase resetting of circadian clock [23, 47] and it has been reported that PKC stabilizes BMAL1, thus preventing its degradation by the 26S proteasome [44]. These facts are in line with the results depicted in Figs. 4 and 5.

Concerning PKA, little is known about its involvement in circadian rhythms and clock proteins, specifically its

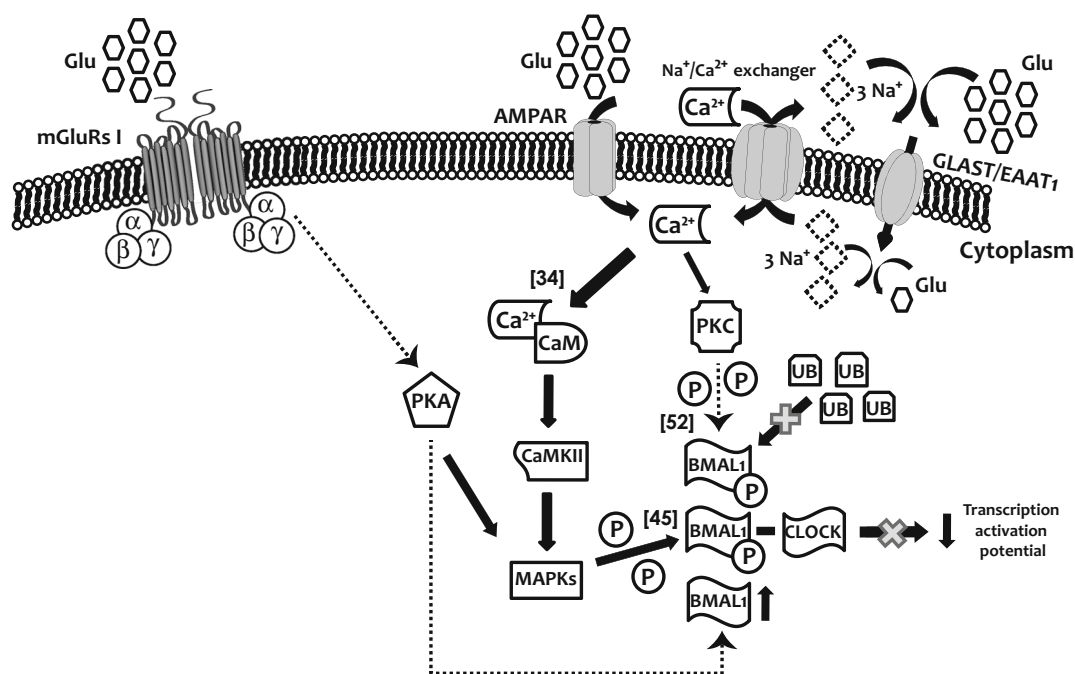


Fig. 6 Current model for Glu-dependent BMAL1 regulation in cultured Bergmann Glia Cells. Other PKA substrates include BMAL1, favoring the increase of BMAL1 levels. Stimulation of Bergmann glia AMPA receptors induces to Ca^{2+} influx; that successively binds to calmodulin (CaM) activating Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinase II (CaMKII) [34], which in turn activates MAPKs. Besides, Ca^{2+} also activates Protein Kinase C (PKC). Subsequently, PKC phosphorylates to BMAL1 at S269 site

impeding BMAL1 ubiquitination (UB) and therefore stabilizes the protein [52]. On the other hand, Glu uptake leads to Na^{+} influx, which activates the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, increasing in intracellular Ca^{2+} levels, and inducing the activation of CaMKII and PKC. Activation of adenylate cyclase (AC) cleaving Protein Kinase A (PKA). Among the substrates of PKA are Mitogen-activated Protein Kinase (MAPKs) that phosphorylates (P) BMAL1 protein in Thr-534 site resulting in a decrease of CLOCK-BMAL1 transcription activation potential [45]

relationship with BMAL1, nonetheless it would be important to dissect the mechanism involved in the stabilizing effect of PKA activation.

In summary, we report here a Glu-dependent regulation of BMAL1 in BGC that might be linked to a PKA/PKC-mediated stabilization. These results should pave the way of our understanding of the role of glial Glu receptors in the molecular regulation of circadian rhythms. A schematic representation of the major findings of this work is presented in Fig. 6. Work currently in progress in our lab is aimed as to dissect the signalling cascades involved in Glu-dependent BMAL1 stabilization.

Acknowledgments This work was supported by grants from Conacyt-Mexico and Fundación Pandeia to A.O. D.C. is supported by Conacyt-Mexico fellowship 249758. The technical assistance of Luis Cid and Blanca Ibarra is acknowledged.

Conflict of interest The authors certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in this manuscript.

References

- Akiyama M, Kirihara T, Takahashi S, Minami Y, Yoshinobu Y, Moriya T, Shibata S (1999) Modulation of mPer1 gene expression by anxiolytic drugs in mouse cerebellum. *Br J Pharmacol* 128:1616–1622
- Barrera I, Flores-Mendez M, Hernandez-Kelly LC, Cid L, Huerta M, Zinker S, Lopez-Bayghen E, Aguilera J, Ortega A (2010) Glutamate regulates eEF1A phosphorylation and ribosomal transit time in Bergmann glial cells. *Neurochem Int* 57:795–803
- Beaulieu C, Swanson A, Leone MJ, Herzog ED (2009) Circadian modulation of gene expression, but not glutamate uptake, in mouse and rat cortical astrocytes. *PLoS one* 4:e7476
- Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenen C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, Bradfield CA (2000) Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103:1009–1017
- Cardone L, Hirayama J, Giordano F, Tamaru T, Palvimo JJ, Sassone-Corsi P (2005) Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science* 309:1390–1394
- Castel M, Belenky M, Cohen S, Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1993) Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 5:368–381
- Cermakian N, Sassone-Corsi P (2000) Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:59–67
- Chung S, Son GH, Kim K (2011) Adrenal peripheral oscillator in generating the circadian glucocorticoid rhythm. *Ann New York Acad Sci* 1220:71–81
- Coutinho V, Knopfel T (2002) Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties. *Neuroscientist* 8:551–561
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1–105
- Dunlap JC (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96:271–290
- Eide EJ, Vielhaber EL, Hinz WA, Virshup DM (2002) The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem* 277:17248–17254
- Feillet CA, Mendoza J, Albrecht U, Pevet P, Challet E (2008) Forebrain oscillators ticking with different clock hands. *Mol Cell Neurosci* 37:209–221
- Gallego M, Virshup DM (2007) Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:139–148
- Gannon RL, Rea MA (1994) In situ hybridization of antisense mRNA oligonucleotides for AMPA, NMDA and metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat suprachiasmatic nucleus at different phases of the circadian cycle. *Mol Brain Res* 23:338–344
- Gorbacheva VY, Kondratov RV, Zhang R, Cherukuri S, Gudkov AV, Takahashi JS, Antoch MP (2005) Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK/BMAL1 transactivation complex. *Proc Natl Acad Sci* 102:3407–3412
- Guilting C, Piggins HD (2007) Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *Eur J Neurosci* 25:3195–3216
- Hertz L, Zielke HR (2004) Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci* 27:735–743
- Hirayama J, Sahar S, Grimaldi B, Tamaru T, Takamatsu K, Nakahata Y, Sassone-Corsi P (2007) CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature* 450:1086–1090
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31–108
- Honma S, Ikeda M, Abe H, Tanahashi Y, Namihira M, Honma K, Nomura M (1998) Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene Clock, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 250:83–87
- Ikeda M, Ikeda M (2014) Bmal1 is an essential regulator for circadian cytosolic Ca²⁺ rhythms in suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci* 34:12029–12038
- Jakubcakova V, Oster H, Tamanini F, Cadenas C, Leitges M, Van der Horst GT, Eichele G (2007) Light entrainment of the mammalian circadian clock by a PRKCA-dependent posttranslational mechanism. *Neuron* 54:831–843
- Kennaway DJ (2005) The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Hum Reprod Update* 11:91–101
- Kim KH, Ha JH, Chung SH, Kim CT, Kim SK, Hyun BH, Sawada K, Fukui Y, Park IK, Lee GJ, Kim BK, Lee NS, Jeong YG (2003) Glutamate and GABA concentrations in the cerebellum of novel ataxic mutant Pogo mice. *J Vet Sci* 4:209–212
- King DP, Takahashi JS (2000) Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci* 23:713–742
- Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV, Antoch MP (2006) Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev* 20:1868–1873
- Kwon I, Lee J, Chang SH, Jung NC, Lee BJ, Son GH, Kim K, Lee KH (2006) BMAL1 shuttling controls transactivation and degradation of the CLOCK/BMAL1 heterodimer. *Mol Cell Biol* 26:7318–7330
- Laposky A, Easton A, Dugovic C, Walisser J, Bradfield C, Turek F (2005) Deletion of the mammalian circadian clock gene BMAL1/Mop3 alters baseline sleep architecture and the response to sleep deprivation. *Sleep* 28:395–409
- Lehre KP, Danbolt NC (1998) The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci* 18:8751–8757
- Liou SY, Shibata S, Iwasaki K, Ueki S (1986) Optic nerve stimulation-induced increase of release of 3H-glutamate and 3H-aspartate but not 3H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res Bull* 16:527–531
- López-Bayghen E, Rosas S, Castelan F, Ortega A (2007) Cerebellar Bergmann glia: an important model to study neuron-glia interactions. *Neuron Glia Biol* 3:155–167

33. López T, López-Colomé AM, Ortega A (1994) AMPA/KA receptor expression in radial glia. *NeuroReport* 5:504–506
34. Martínez-Lozada Z, Hernández-Kelly LC, Aguilera J, López-Bayghen E, Ortega A (2011) Signaling through EAAT-1/GLAST in cultured Bergmann glia cells. *Neurochem Int* 59:871–879
35. Mendoza J, Pévet P, Felder-Schmittbuhl MP, Bailly Y, Challet E (2010) The cerebellum harbors a circadian oscillator involved in food anticipation. *J Neurosci* 30:1894–1904
36. Morin LP, Allen CN (2006) The circadian visual system, 2005. *Brain Res Rev* 51:1–60
37. Müller T, Möller T, Berger T, Schnitzer J, Kettenmann H (1992) Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. *Science* 256:1563–1566
38. Namihira M, Honma S, Abe H, Tanahashi Y, Ikeda M, Honma K (1999) Daily variation and light responsiveness of mammalian clock gene, *Clock* and *BMAL1*, transcripts in the pineal body and different areas of brain in rats. *Neurosci Lett* 267:69–72
39. Ortega A, Eshhar N, Teichberg VI (1991) Properties of kainate receptor/channels on cultured Bergmann glia. *Neuroscience* 41:335–349
40. Reppert SM, Weaver DR (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 63:647–676
41. Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB, Fitzgerald GA (2004) *BMAL1* and *CLOCK*, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol* 2:e377
42. Ruiz M, Ortega A (1995) Characterization of an Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from cultured Bergmann glia. *NeuroReport* 6:2041–2044
43. Sahar S, Zocchi L, Kinoshita C, Borrelli E, Sassone-Corsi P (2010) Regulation of *BMAL1* protein stability and circadian function by GSK3 beta-mediated phosphorylation. *PLoS One* 5:e8561
44. Saito N, Shirai Y (2002) Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype. *J Biochem* 132:683–687
45. Sanada K, Okano T, Fukada Y (2002) Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-PAS transcription factor *BMAL1*. *J Biol Chem* 277:267–271
46. Schibler U, Sassone-Corsi P (2002) A web of circadian pace-makers. *Cell* 111:919–922
47. Shim HS, Kim H, Lee J, Son GH, Cho S, Oh TH, Kang SH, Seen DS, Lee KH, Kim K (2007) Rapid activation of *CLOCK* by Ca²⁺-dependent protein kinase C mediates resetting of the mammalian circadian clock. *EMBO Rep* 8:366–371
48. Somogyi P, Eshhar N, Teichberg VI, Roberts JD (1990) Subcellular localization of a putative kainate receptor in Bergmann glial cells using a monoclonal antibody in the chick and fish cerebellar cortex. *Neuroscience* 35:9–30
49. Stratmann M, Schibler U (2006) Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. *J Biol Rhythms* 21:494–506
50. Tamaru T, Hirayama J, Isojima Y, Nagai K, Norioka S, Takamatsu K, Sassone-Corsi P (2009) *CK2alpha* phosphorylates *BMAL1* to regulate the mammalian clock. *Nat Struct Mol Biol* 16:446–448
51. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288:682–685
52. Zhang L, Abraham D, Lin ST, Oster H, Eichele G, Fu YH, Ptáček LJ (2012) *PKCγ* participates in food entrainment by regulating *BMAL1*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:20679–20684
53. Zhang L, Kolaj M, Renaud LP (2006) Suprachiasmatic nucleus communicates with anterior thalamic paraventricular nucleus neurons via rapid glutamatergic and GABAergic neurotransmission: state-dependent response patterns observed in vitro. *Neuroscience* 141:2059–2066