

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**TÍTULO**

**“Rol del Sistema GABAérgico en la Regulación del Desarrollo y la Fisiología de la  
Glándula Pineal de Rata”**

por

**Lic. Sergio Gonzalo Benitez**



**Directora: Dra. Estela Maris Muñoz**



**Lugar de Trabajo**

**Instituto de Histología y Embriología de Mendoza**

**Dr. Mario H. Burgos.**

**FCM. UNCuyo.**



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**Córdoba, Argentina**

**2015**

## **COMISIÓN ASESORA**

Dr. Mario Eduardo Guido. CIQUIBIC-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Dra. Nancy Alicia Salvatierra. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.

Dra. Estela Maris Muñoz. IHEM-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo.

## **DEFENSA ORAL Y PÚBLICA**

Lugar y Fecha:

Calificación:

### **TRIBUNAL**

Firma: ..... Dra. Ana Cecilia Anzulovich Miranda

Firma: ..... Dr. Mario Eduardo Guido

Firma: ..... Dra. Nancy Alicia Salvatierra

# *Agradecimientos*

*Agradezco a mi familia, mi hermosa Clau por su apoyo y su amor, a mi Gonzalito la luz que alumbra cada uno de mis días y a Franquito nuestro pequeño retoño*

*A mis viejos que no dejan de brindarme su amor en cada paso de mi vida*

*A mis hermanos, que los siento tan cerca aunque estén lejos*

*A mi directora que me ha enseñado a dar siempre lo mejor y me apoyó con su experiencia en todo este proceso de formación*

*A mis compañeros de laboratorio que me brindaron su apoyo y amistad*

*Al personal de apoyo que siempre se mostró dispuesto a ayudarme*

*A la Dra. Penissi por su ayuda con las mediciones de HPLC*

## Publicaciones científicas asociadas con este trabajo de Tesis

### Doctoral

1. Título: “Hypoxic preconditioning differentially affects GABAergic and glutamatergic neuronal cells in the injured cerebellum of the neonatal rat”. PLOS ONE 9(7):e102056. DOI: 10.1371/journal.pone.0102056. eCollection 2014.

Autores: **Benitez SG\***, Castro AE\*, Patterson SI, Muñoz EM# y Seltzer AM#.

\*# Contribución equivalente de ambos autores.

2. Título: “Expression and cellular localization of the transcription factor NeuroD1 in the developing and adult rat pineal gland”. J Pineal Res.; 58(4):439-51. doi: 10.1111/jpi.12228. Epub 2015.

Autores: Castro AE, **Benitez SG**, Farías Altamirano LE, Savastano LE, Patterson SI y Muñoz EM.

3. Título: “GABAergic system in the adult rat pineal gland”.

Autores: **Benitez SG**, Farías Altamirano LE y Muñoz EM.

Estado: en preparación.

4. Título: “Role of  $\text{RGABA}_B$  in determining and maintaining the pineal phenotype”

Autores: Futuro Doctorando/a, **Benitez SG** y Muñoz EM.

Estado: en proyección.

## ÍNDICE

<b>Agradecimientos</b>	<b>ii</b>
<b>Publicaciones científicas asociadas a esta Tesis</b>	<b>iii</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b><i>SUMMARY</i></b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>HIPÓTESIS GENERAL</b>	<b>35</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>35</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>35</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>36</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>50</b>
<b><i>Capítulo I</i></b>	<b>50</b>
<b><i>Capítulo II</i></b>	<b>81</b>
<b><i>Capítulo III</i></b>	<b>123</b>
<b><i>Capítulo IV</i></b>	<b>135</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>144</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>162</b>
<b>Proyecciones futuras</b>	<b>166</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>167</b>

## **Abreviaturas**

**5-HT:** serotonina

**AANAT:** arilalquilamina N-acetiltransferasa

**AC:** adenilato o adenilil ciclasa

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**AMPc:** adenosin monofosfato cíclico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**BETA2:** transactivador del *E-box* en células  $\beta$  2

**BIC:** bicuculina

**bHLH:** *basic helix-loop-helix*

**Ca<sup>+2</sup>:** calcio

**CaMKs:** quinasas dependientes del Ca<sup>+2</sup>/calmodulina

**CCG:** capa de células granulares de la retina

**CGE:** capa granular externa

**CGI:** capa granular interna

**CM:** capa molecular

**Cl<sup>-</sup>:** ion cloruro

**CLOCK:** *circadian locomotor output cycles kaput*

**CON:** control

**CP:** comisura posterior

**CPI:** capa plexiforme interna

**CPk:** capa de células de Purkinje

**CRE:** elementos de respuesta al AMPc

**CREB:** proteína de unión al sitio CRE

**Crx:** *cone-rod homeobox*

**Cry:** criptocromo

**DAPI:** 4', 6-diamidino-2-phenilindol

**Egr1:** *early growth response 1*

**EP:** epitelio pigmentario

**IHQ:** inmunohistoquímica

**G0:** proteína G0

**GABA:** ácido gamma-aminobutírico

**GABA-T:** GABA transaminasa  
**GAD67:** ácido glutámico decarboxilasa (enzima)  
**Gad1:** ácido glutámico decarboxilasa 1 (gen)  
**GAT:** transportador de GABA  
**GC:** guanilato o guanidil ciclasa  
**GCS:** ganglio cervical superior  
**GCSx:** ganglionectomía cervical superior  
**GFAP:** proteína ácida fibrilar glial  
**GLU:** glutamato  
**GLUR1:** *ionotropic glutamate receptor 1*  
**GMPc:** guanosín monofosfato cíclico  
**GP:** glándula pineal  
**HIOMT:** hidroxil-indol O-metil transferasa  
**HIS:** hibridación *in situ*  
**HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>:** bicarbonato  
**HPLC:** *high-performance liquid chromatography*  
**Iba1:** *ionized calcium binding adaptor molecule 1*  
**ICER:** represor temprano de AMPc inducible  
**Id:** inhibidor de la diferenciación  
**IHQ:** inmunohistoquímica  
**IP3:** inositol trifosfato  
**IP:** yoduro de propidio  
**i.p.:** intraperitoneal  
**K<sup>+</sup>:** ion potasio  
**kDa:** kilodalton.  
**KO:** *knock-out*  
**L:O:** ciclo luz / oscuridad  
**MAPK:** proteína quinasa activada por mitógenos  
**mGluR3:** receptor metabotrópico de glutamato 3  
**mGluR5:** *metabotropic glutamate receptors 5*  
**MT:** receptor de melatonina  
**MUS:** muscimol  
**NA:** noradrenalina  
**NAS:** N-acetilserotonina

**NeuroD1:** factor de diferenciación neuronal 1  
**NIL:** núcleos intermediolaterales  
**NPY:** neuropéptido Y  
**NPV:** núcleos paraventriculares  
**NSQ:** núcleos supraquiasmáticos  
**ON:** óxido nítrico  
**Otx2:** *orthodenticle homeobox 2*  
**OSC:** órgano subcomisural  
**Pax6:** paired box 6  
**pb:** pares de bases  
**PBS:** *phosphate buffered saline*  
**pCREB:** CREB fosforilado  
**PFA:** paraformaldehído  
**Per:** periodo  
**PLC:** fosfolipasa C  
**PKA:** proteína quinasa A  
**PKC:** proteína quinasa C  
**RGABA<sub>A</sub>:** receptor de GABA A  
**RGABA<sub>A</sub>α1:** subunidad α 1 del receptor de GABA A  
**RGABA<sub>B</sub>:** receptor de GABA B  
**RGABA<sub>B</sub>1:** subunidad B1 del receptor de GABA B  
**RT-PCR:** *reverse transcription polymerase chain reaction*  
**rTh:** *rostral thalamus*  
**S100β:** *S100 calcium binding protein B*  
**SNC:** sistema nervioso central  
**TH:** tirosina hidroxilasa  
**TPH:** triptófano hidroxilasa.  
**Trp:** triptófano  
**Tuj1:** tubulina III β  
**VEGF:** factor de crecimiento del endotelio vascular  
**VIAAT:** *vesicular inhibitory amino acid transporter*  
**VGAT:** *vesicular GABA transporter*  
**VIM:** vimentina



**VGLUT:** transportador de glutamato vesicular

**WB:** *western blot*

**ZNb:** zona neuroblástica

**ZMC:** zona marginal ciliar

**ZT:** dador de tiempo (del alemán *zeitgeber time*)

# **RESUMEN**

La fisiología de los organismos está sujeta a una regulación circadiana cuya función es organizar temporalmente procesos metabólicos y conductuales, facilitando así la adaptación de los organismos a las modificaciones del ambiente. La glándula pineal (GP) es la principal fuente de melatonina circulante y uno de los centros efectores y reguladores del sistema circadiano. En mamíferos, el sistema fotoneuroendócrino es el encargado de sincronizar el ritmo circadiano de síntesis y secreción de esta hormona con la luz ambiental mediante la descarga nocturna de noradrenalina (NA) a nivel local. Sin embargo, inervaciones no simpáticas y otros neurotransmisores han sido involucrados en la modulación de la fisiología pineal, incluido el GABA. El presente trabajo de Tesis se basó en la hipótesis que el sistema GABAérgico influenciaría la ontogenia y el fenotipo pineal, y que la diferenciación de la población celular GABAérgica propia de la GP requiere de la inhibición de la actividad del factor de transcripción NeuroD1. En la GP embrionaria no pudimos detectar células GABAérgicas ni las subunidades de los receptores GABA analizadas, aunque sí observamos fibras nerviosas de origen central conteniendo la enzima biosintética GAD67. En la GP adulta, la inervación GABAérgica mostró un marcado tropismo por los vasos sanguíneos. Además se logró caracterizar una subpoblación de células vimentina positivas en el intersticio glandular (aproximadamente el 5% del total de células en la GP) que también expresan GAD65, GAD67 y GABA en sus citoplasmas. Por su parte, la localización de subunidades de receptores ionotrópicos y metabotrópicos, RGABA<sub>A</sub>α1 y RGABA<sub>B</sub>1, respectivamente, involucraría al GABA en la modulación pre-sináptica de fibras nerviosas GABAérgicas y simpáticas, en la regulación del tono vascular y el mantenimiento del estado quiescente de potenciales precursores Pax6<sup>+</sup> en la GP adulta. El factor de transcripción NeuroD1 presente durante toda la ontogenia de la GP, estaría relacionado a la diferenciación del fenotipo glutamatérgico de los pinealocitos y su actividad transcripcional estaría impedida en una subpoblación de células intersticiales para permitir el desarrollo del fenotipo GABAérgico. Desde el punto de vista funcional, encontramos que la manipulación farmacológica *in vivo* e *in vitro* de los RGABA<sub>A</sub> altera los niveles de serotonina en la GP, sugiriendo un efecto inhibitorio del GABA sobre la síntesis y secreción de melatonina inducida por NA.

# SUMMARY

Circadian modulation of organismal physiology and behavior facilitates adaptation to environmental changes. One of the principal regulators of the mammalian circadian timing system is the pineal gland (PG), which is the main source of circulating melatonin, a major endocrine effector of the system. This system synchronizes the rhythmic release of melatonin with the light:dark (L:D) cycle via local autonomic release of noradrenaline (NA) at night. Non-sympathetic innervation and other neurotransmitters, including GABA, have also been implicated in modulating pineal physiology, but their mechanisms have not yet been fully elucidated. In this thesis, the hypothesis that the GABAergic system influences pineal ontogeny and phenotype, and that the differentiation of the pineal GABAergic cell population requires the inhibition of NeuroD1 transcriptional activity is examined. Despite the fact that neither GABAergic cells nor GABA receptors were detectable in the embryonic PG; central nervous system fibers positive for the GABAergic biosynthetic enzyme GAD67 were observed. In the adult PG, the GABAergic innervation showed a marked tropism for blood vessels. A subpopulation of interstitial cells (approximately 5% of total cells in PG) immune-positive for cytoplasmic vimentin, GAD65, GAD67 and GABA was clearly identifiable in the adult PG. The spatial and temporal distribution of the  $\alpha 1$  subunit of the ionotropic GABA<sub>A</sub> receptor and the B1 subtype of the metabotropic GABA<sub>B</sub> receptor, implicates GABA in the presynaptic modulation of GABAergic and sympathetic nerve fibers, in vascular tone regulation, and in the maintenance of the quiescent status of potential Pax6<sup>+</sup> precursors in the adult PG. NeuroD1, a bHLH transcription factor present throughout the entire PG ontogeny, might be inhibited in a subpopulation of interstitial cells with GABAergic phenotype. *In vivo* and *in vitro* pharmacological manipulations of GABA<sub>A</sub> receptors altered pineal serotonin levels, suggesting an inhibitory effect of GABA on the synthesis and secretion of NA-induced melatonin.

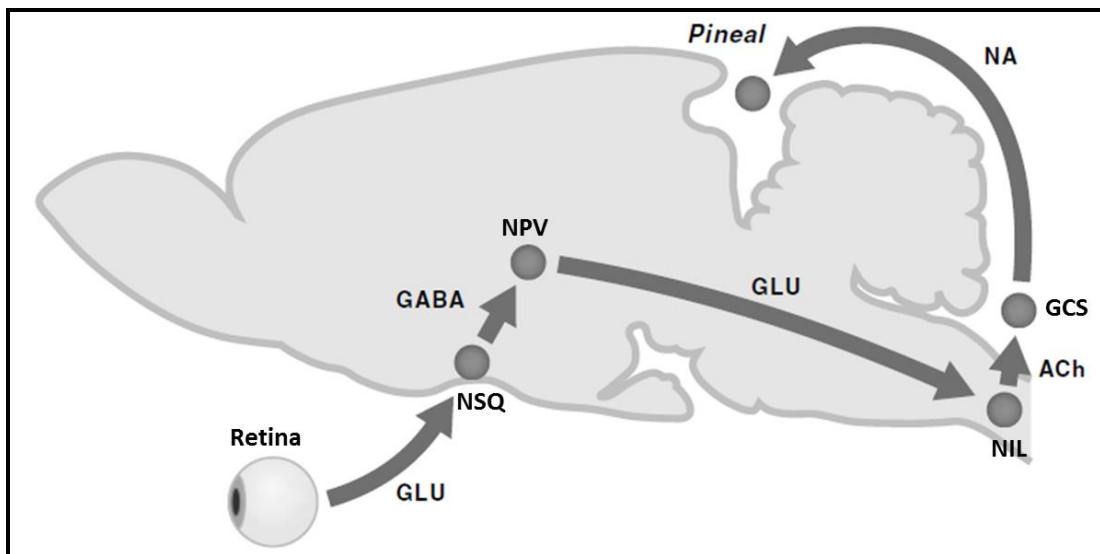
# **INTRODUCCIÓN**

## Sistema fotoneuroendócrino-glándula pineal

Los organismos en general están sujetos a una regulación circadiana, cuya función es organizar en el tiempo procesos fisiológicos y conductuales con una periodicidad cercana a las 24 horas, facilitando de esta manera la adaptación a los cambios cíclicos del ambiente.

La glándula pineal (GP) es un órgano neuroendocrino que convierte la información del fotoperiodo en una señal hormonal mediante la síntesis y secreción de melatonina, por lo que es considerada tanto efectora como reguladora del sistema circadiano [1]. La producción de melatonina sigue un patrón circadiano con un pico nocturno característico, lo que la convierte en un dador endógeno de información diaria y estacional [2]. Esta pequeña hormona de naturaleza hidrofóbica es una indolamina y recibe su nombre a partir del efecto que tiene sobre los melanóforos de anfibios [3]. Es liberada al torrente sanguíneo a medida que se produce, sin conocerse hasta la actualidad ningún sistema de almacenamiento para la misma. La melatonina actúa en múltiples órganos y tejidos por interacción con receptores específicos [4]. Se han descrito tres subtipos de receptores de melatonina que pertenecen a la superfamilia de receptores de membrana asociados a proteínas G o proteínas reguladoras heterotriméricas ligadas a GTP. Los receptores MT1 (mel1a) y MT2 (mel1b) han sido identificados en todos los vertebrados, mientras que el MT3 (mel1c) solo en especies no-mamíferas [5-7]. Además de la actividad mediada por receptores, se sabe que la melatonina posee otras propiedades consideradas beneficiosas como las antioxidantes [8]. Estudios con ratones deficientes en melatonina, animales pinealectomizados y modelos murinos KO (*Knock-out*) para los receptores de melatonina, entre otras herramientas, revelan el rol cronobiológico de esta hormona en numerosos órganos [9]. La importancia de la melatonina en la fisiología y comportamiento es puesta en evidencia con la inclusión de numerosos polimorfismos de genes de la vía biosintética de esta hormona como factores de riesgo para diversas patologías [10-13]. Por ejemplo, polimorfismos en el gen *aanat* que codifica a la enzima limitante arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT) han sido asociados a una mayor susceptibilidad al síndrome de depresión mayor [14]. Asimismo, varias patologías humanas incluidos los desórdenes maníaco-depresivos, autismo, cáncer y diabetes, entre otras, han sido relacionadas con alteraciones en ritmos circadianos siendo los trastornos del sueño una de las manifestaciones más frecuentes [15-19].

Dentro de los *zeitgebers* (ZT) o señales capaces de dictar la noción de tiempo a un organismo, el ciclo luz-oscuridad (L:O) ha sido y es considerado un factor clave en la evolución y supervivencia de los seres vivos. En cuanto a la melatonina nocturna, es conocida su inhibición por pulsos de luz que impactan sobre los fotorreceptores retinianos. La retina constituye uno de los centros de relevo de un circuito multisináptico conocido como sistema fotoneuroendócrino, en el cual los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos (NSQ) representan el reloj circadiano maestro que controla la fisiología de la GP. Mediante trazadores retrógrados y anterógrados se logró dilucidar todo el circuito nervioso que incluye a los nervios ópticos como conectores entre la retina y los NSQ. Las neuronas supraquiasmáticas se conectan con las de los núcleos paraventriculares (NPV), los que a su vez proyectan hacia los núcleos intermediolaterales (NIL). De los NIL salen proyecciones que contactan con los ganglios cervicales superiores (GCS), los que finalmente inervan mediante los nervios conarios a la GP. Esta cadena de centros de relevo de información es compleja e involucra una gran variedad de neurotransmisores los cuales se resumen en el siguiente esquema (FIG. 1).



**FIG. 1: Vía multisináptica y neurotransmisores involucrados en la regulación fótica y circadiana del ritmo de melatonina.**

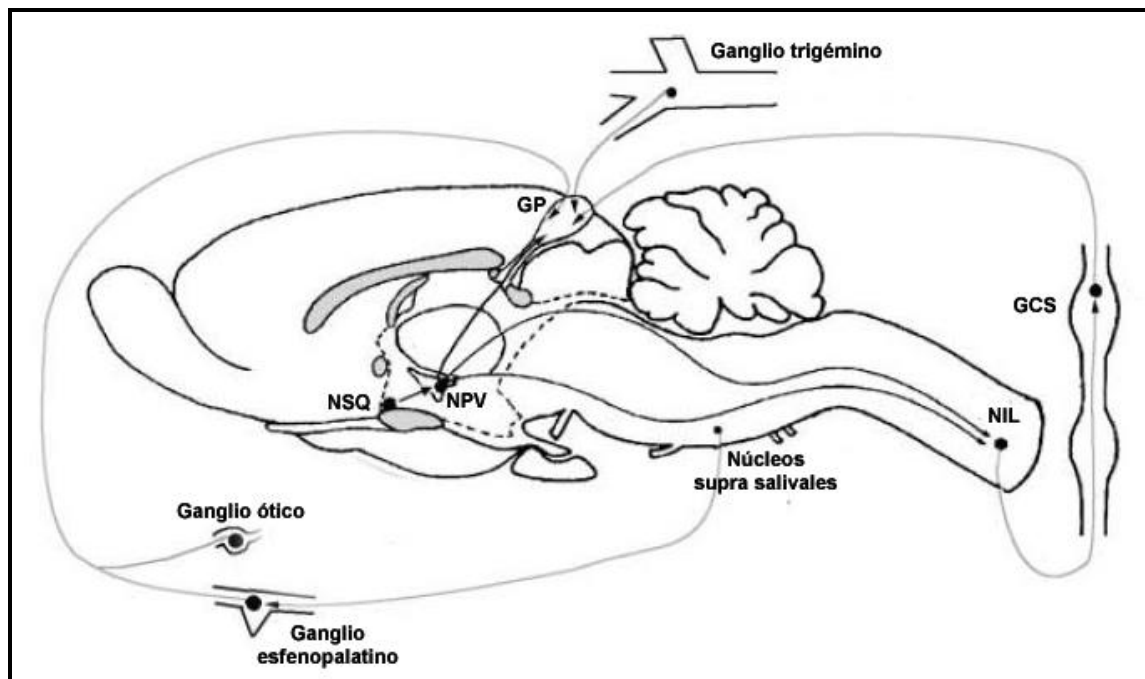
Los nervios ópticos descargan glutamato (GLU) en los NSQ, los cuales inhiben las neuronas de los NPV mediante la liberación del ácido gamma-aminobutírico (GABA). La conexión entre los NPV y los NIL es mediada por GLU nuevamente y las terminales de los NIL a su vez descargan acetilcolina (ACh) en las neuronas de los GCS, los que finalmente liberan la noradrenalina (NA) que impacta en receptores de membrana específicos en los pinealocitos de la GP. Modificado de Kalsbeek y cols., 2000 [21].

La luz detectada por los fotorreceptores retinianos induce la liberación de glutamato (GLU) a nivel de los terminales nerviosos de las células ganglionares que inervan a los NSQ. Las neuronas del principal oscilador endógeno responden mediante la liberación del ácido gamma-aminobutírico (GABA) en los NPV produciendo la hiperpolarización de sus neuronas e inhibiendo la liberación de GLU por parte de las mismas. Esto quiere decir que durante la fase de luz o luz subjetiva los NSQ mantienen inhibidos a los NPV, esto interrumpe el circuito evitando la descarga de acetilcolina por parte de las neuronas de los NIL y por ende, la de noradrenalina (NA) de los terminales simpáticos que abordan la GP. En resumen la señal activa de generación de melatonina proviene de la descarga de GLU de los NPV y la función de los NSQ es inhibirlos rítmicamente [20, 21]. En experimentos de ablación o lesión de los NSQ no se suprime la síntesis de melatonina pero si el ritmo.

### **Inervación no simpática de la glándula pineal**

La inervación simpática es considerada la principal vía regulatoria del ritmo de melatonina y la gran mayoría de los estudios en las últimas décadas se han centrado en ella. Sin embargo se sabe que la GP recibe otras proyecciones nerviosas y que otros neurotransmisores diferentes a la NA modularían su función endocrina [22]. Estas vías llamadas no-simpáticas han sido estudiadas por varios autores y uno de los modelos más utilizados ha sido el de la ganglionectomía cervical superior bilateral (GCSx), que libera a la GP de la regulación noradrenérgica pudiéndose analizar la influencia de otras inervaciones.

En el siguiente esquema se ilustran algunas de las múltiples inervaciones conocidas de la GP (FIG. 2).



**FIG. 2: Distintas inervaciones de la glándula pineal.**

Se pueden apreciar las múltiples vías que arriban a la GP y sus recorridos. Modificado de Møller y Baeres, 2002 [22].

Las vías de inervación parasimpática originadas en los ganglios esfenopalatinos y óticos, utilizarían como principales transmisores al péptido intestinal vasoactivo y al péptido histidina isoleucina [22]. El ganglio trigémino sensorial también proyecta hacia la GP liberando diversos péptidos, de los cuales PACAP (del inglés *pituitary adenylate cyclase-activating peptide*) estimularía la secreción de melatonina [23, 24].

La llamada inervación central está formada por proyecciones de neuronas ubicadas en la región media de los NPV, los núcleos geniculados laterales, el hipotálamo lateral y el núcleo dorsal del rafe. En roedores, esta inervación penetra la pineal profunda y el tallo. Mediante inmunohistoquímica (IHQ) se detectó vasopresina y oxitocina en terminales provenientes de los NPV [25]. Terminales positivas para orexina (hipocretina) provenientes del área dorsolateral hipotalámica penetran la pineal profunda; estudios *in vitro* indican que el impacto de esta molécula sobre sus receptores ubicados en las



membranas de pinealocitos inhibiría la estimulación de la síntesis de melatonina por parte de la NA [26]. Además, mediante experimentos quirúrgicos de ablación de la innervación central, se observó una reducción de la actividad de las enzimas relacionadas con la síntesis de melatonina en los animales operados con respecto a los controles [27]. Mediante estudios por inmunohistoquímica (IHQ) al microscopio óptico y electrónico se observó que a la GP también llegan fibras GABAérgicas que forman parte de la innervación central. En roedores, estas fibras parecen provenir de las comisuras habenuar y posterior, y se extienden a través del tallo hasta la pineal profunda. En la GP de ratón se pudieron observar contactos tipo sinápticos entre estas fibras GABAérgicas y pinealocitos [28]. El origen preciso de estas fibras no es claro pero probablemente provengan de neuronas de los núcleos geniculados laterales.

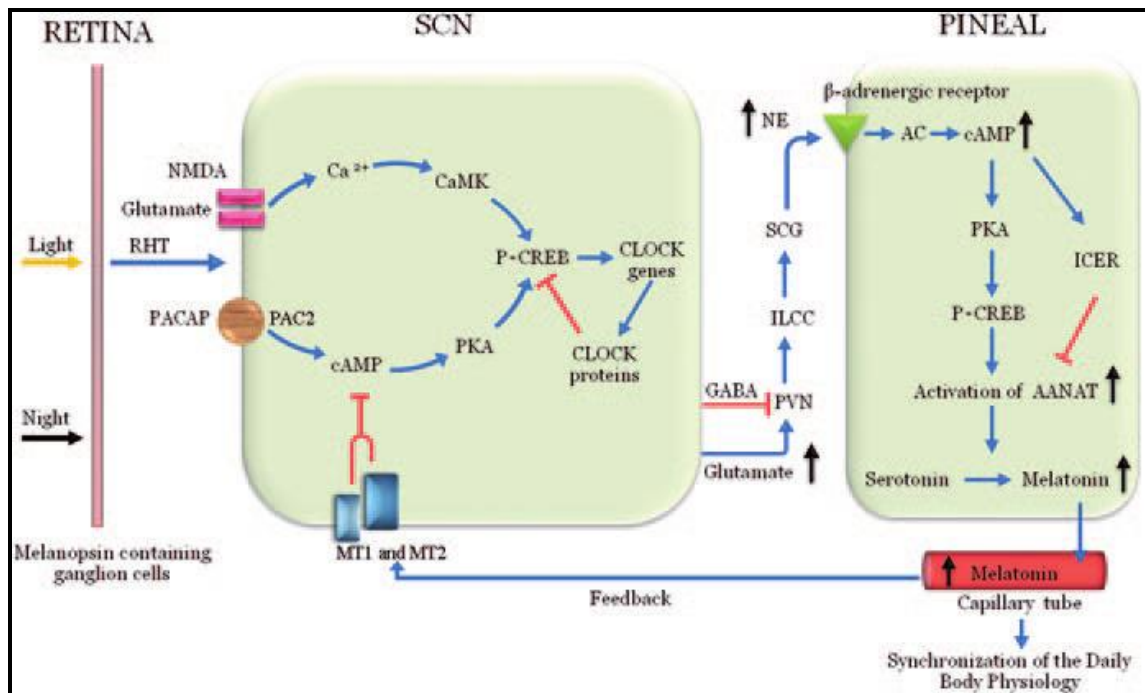
## Mecanismo molecular de regulación de la melatonina por la noradrenalina

La NA liberada durante la fase nocturna impacta directamente sobre receptores adrenérgicos  $\beta_1$  y  $\alpha_1$  anclados en la membrana plasmática de los pinealocitos. La unión de NA a los  $\beta_1$  activa a la enzima adenilato ciclasa (AC), lo cual produce un incremento en los niveles del adenosil monofosfato cíclico (AMPC), siendo este segundo mensajero clave en la activación y silenciamiento de la expresión del gen *aanat* que codifica a la enzima limitante AANAT [29-32]. La presencia del elemento de respuesta al AMPC CRE (del inglés *cAMP-responsive element*) en la región regulatoria del gen que codifica para el receptor adrenérgico  $\beta_1$  es responsable del ritmo circadiano en la expresión de su ARNm, con un aumento significativo en sus niveles durante la fase nocturna [33]. El AMPC activa a la proteína quinasa A (PKA), liberando las subunidades catalíticas de las regulatorias, siendo las primeras translocadas al compartimento nuclear de los pinealocitos donde fosforilan a sus proteínas blanco [34]. A nivel nuclear, la PKA fosforila al factor de transcripción CREB (del inglés *cAMP-responsive element binding protein*) sobre su residuo serina 133 (Ser<sup>133</sup>, pCREB), ya que dicho factor se localiza constitutivamente en ese compartimento subcelular en su forma no fosforilada. Esta fosforilación favorece la unión del pCREB con elementos CREs ubicados en regiones regulatorias del gen *aanat* y de otros genes blanco. En la GP de rata, este evento se traduce en un incremento de aproximadamente 150 veces en los niveles del ARNm de la enzima AANAT durante la

noche (en la retina el aumento es de unas 10 veces); cayendo a niveles prácticamente indetectables durante la fase diurna [35]. El mecanismo arriba descrito es uno de los principales eventos que induce el pico de melatonina nocturna en rata alrededor de la media noche. Esa marcada activación transcripcional del gen *aanat* convierte a la rata en el modelo ideal para el estudio de los procesos moleculares que modulan el ritmo de melatonina, a diferencia de la mayoría de las cepas endocriadas de ratón utilizadas en investigación que presentan mutaciones espontáneas a diferentes niveles en la cascada biosintética de melatonina [36-38]. Por otra parte, el final de la fase nocturna es precedido por un pico en la expresión del ICER (del inglés *inducible cAMP early repressor*), el cual no es solo blanco sino también un potente regulador negativo de la transcripción dependiente de AMPc y por ende, uno de los responsables de la caída de los niveles nocturnos de melatonina [31]. La vía NA /  $\beta 1$  / AMPc / PKA regula adicionalmente la síntesis del indol a través de procesos moleculares independientes de la activación nuclear del CREB, por ejemplo, mediante la fosforilación de la propia AANAT en el citoplasma lo que le permite formar un complejo con la proteína 14-3-3, estabilizarse y escapar de la degradación proteosomal [39-42].

Al mismo tiempo que la NA impacta sobre los receptores adrenérgicos  $\beta 1$ , lo hace sobre los  $\alpha 1$ . Los receptores  $\alpha 1$  asociados a proteínas  $G_q$  media la activación de la fosfolipasa C que conduce a un incremento de la acumulación de diacilglicerol [43, 44] y además produce un aumento del  $Ca^{+2}$  citoplasmático partir de la entrada desde el medio extracelular y de los reservorios intracelulares [32, 45-47]. El aumento de  $Ca^{+2}$  y diacilglicerol activan a la PKC (del inglés *protein kinase C*) que potencia la activación de la AC aumentando la sensibilidad del sistema y promoviendo una rápida elevación de la síntesis de melatonina [48]. Esta vía también involucra a miembros de las MAPK (del inglés *mitogen activated protein kinase*) que a través de una cascada de activación,  $Ca^{+2}$  / guanidil ciclasa (GC) / guanósín monofosfato cíclico (GMPc) / PKC / MAPK, regulan la estabilidad de la proteína AANAT mediante fosforilaciones que modulan su proteólisis a nivel proteosomal [49].

Estos y otros antecedentes nos permiten concluir que la generación del ritmo de melatonina en la GP de mamíferos es consecuencia de una fina interacción entre elementos activadores y represores que actúan cronológicamente y en forma coordinada. Parte de la secuencia regulatoria descripta se resume en la FIG. 3.



**FIG. 3: Esquema del sistema de regulación de la síntesis de melatonina.**

Las células ganglionares de la retina relevan la información fótica vía el tracto retino hipotalámico a los NSQ por liberación de glutamato y PACAP, que actúan sobre las CaMK y la PKA, a través de la activación de los receptores NMDA y PAC2 respectivamente. Esto produce un aumento de P-CREB lo cual regula la expresión de los genes reloj de los NSQ. La información temporal es relevada en los NSQ a través de la liberación de GABA de sus terminales que contactan a los NPV, los cuales a su vez regulan a través de la columna de células intermediolaterales (CCIL) a las neuronas de los GCS. Entonces, durante la fase de oscuridad, la información viaja a través de los GCS en forma de descarga de NA que impacta en los receptores  $\beta$  adrenérgicos en la GP estimulando a la AC produciendo un incremento de AMPc lo cual activa a la PKA que fosforila al CREB pasándolo a su forma activa P-CREB. Esta vía lleva a un aumento de la enzima AANAT y a la producción de melatonina. Por otro lado, el AMPc también induce la expresión del factor de transcripción negativo ICER. Además la melatonina circulante impacta sobre los receptores MT1 y MT2 en los NSQ y reinicia el reloj.

Abreviaturas en inglés: RHT: *retinohypothalamic tract*. PACAP: *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*. cAMP: *cyclic adenosine monophosphate*. CREB: *cAMP response element-binding*. P-CREB: *phosphorylated CREB*. CaMK: *calmodulin kinase*. PKA: *protein kinase A*. GABA: *gamma-aminobutyric acid*. PVN: *periventricular nucleus*. SCG: *superior cervical ganglion*. ILCC: *intermediolateral cell column*. NE: *norepinephrine*. AC: *adenylate cyclase*. AANAT: *arylalkylamine N-acetyltransferase*. ICER: *inducible cAMP early repressor*. Extraído del libro "Brain Aging and Therapeutic Interventions", Mahendra K. Thakur y Suresh I. S. Rattan 2012 [50].

## Los niveles del precursor serotonina también son regulados por la descarga nocturna de noradrenalina

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) es un neurotransmisor que cumple diversos roles en el sistema nervioso central y periférico [51]. En la GP su concentración es elevada debido a la presencia de las enzimas biosintéticas incluida la triptófano hidroxilasa (TPH) que cataliza la hidroxilación del aminoácido L-triptófano de manera rítmica y dependiente de NA [52]. En el citoplasma de los pinealocitos el producto de la TPH es convertido en serotonina por descarboxilación enzimática, la 5-HT es acetilada a N-acetilserotonina (NAS) por la enzima limitante AANAT y finalmente O-metilada por la hidroxindol O-metil transferasa (HIOMT) para ser transformada en melatonina [53]. Como mencionamos anteriormente, esta vía multienzimática está regulada por la descarga nocturna de NA siendo considerados en principio, los niveles de serotonina opuestos a los del producto melatonina y por ende utilizados como un marcador indirecto de dicha vía.

Sin embargo, Sun y cols. mediante el uso de técnicas especiales de microdiálisis describieron un perfil trifásico de serotonina en GP [54]. Según dichos autores los niveles de serotonina son elevados y constantes durante la fase de luz, pero se produce un pico aún más alto en la noche temprana para finalmente caer a niveles bajos en el resto de la fase de oscuridad. Es decir que la NA estimula la producción de serotonina al igual que lo hace con el producto indólico final, por lo que al comienzo de la fase de oscuridad ambas moléculas aumentan su concentración. En el resto de ciclo L:O ambos indoles guardan una relación inversa.

## Características morfológicas de la glándula pineal

En la mayoría de los mamíferos la GP es una estructura única simétrica que se encuentra ubicada en la parte dorso-central del cerebro, entre el mesencéfalo y el diencefalo, aunque la morfología varía según la especie. En roedores la GP es elongada y se la subdivide en una porción superficial que se localiza en la parte superior caudal a los hemisferios cerebrales y una porción profunda consistente en una colección de pinealocitos próximos al tercer ventrículo. Ambas partes se encuentran unidas por el tallo constituido

también por células productoras de melatonina [22, 41]. La GP posee una rica red de capilares anastomosados alimentados por ramificaciones de las arterias cerebrales posteriores que drenan vía vasos eferentes en la gran vena cerebral y el seno confluyente [55]. Esta red vascular genera una amplia superficie de contacto entre pinealocitos y la circulación sanguínea, la cual es fundamental para un órgano endocrino. Los tipos de capilares que encontramos en la GP de mamíferos presentan una considerable variabilidad inter-especie. En vaca, chinchilla, oveja, gato, mono y en fetos humanos los capilares de la GP están envueltos por una capa continua de células epiteliales que evitan el paso de grandes moléculas y funcionan como la barrera hematoencefálica [56-59]. En cambio en rata y ratón las células endoteliales presentan fenestraciones o poros en las zonas citoplasmáticas delgadas y no forman uniones intercelulares estrechas por lo que ambas especies carecen de barrera hematoencefálica [60, 61]. La GP superficial de hámster dorado representa un caso intermedio ya que se encontraron capilares continuos en la región dorsal y fenestrados en la ventral [62]. Dentro de la literatura relativamente reducida sobre regulación de la vasculatura pineal, el trabajo de Kaur y cols. muestra la relación bidireccional entre la misma y los pinealocitos. En un modelo hipóxico los autores observaron un incremento en la producción de óxido nítrico (ON) y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en la GP con el consiguiente aumento de la permeabilidad vascular a la que atribuyen indirectamente la caída en la producción de melatonina [63]. En la dirección opuesta, la administración exógena del indol redujo significativamente los efectos de la hipoxia. Frente a la escasez de antecedentes, son necesarios nuevos estudios sobre la regulación de la vasculatura pineal incluida su naturaleza circadiana.

## Origen evolutivo de la glándula pineal

La mayoría de los eventos fisiológicos y conductuales de los organismos vivos son rítmicos, siendo las oscilaciones anuales y circadianas las más estudiadas. El patrón nocturno de síntesis y secreción de melatonina por la GP es un fenómeno altamente conservado, no obstante las vías por las cuales la información del fotoperiodo regula el ritmo del indol han estado sujetas a profundas modificaciones desde vertebrados inferiores a mamíferos. En peces y anfibios la recepción de la luz se produce directamente en las células de la GP, a diferencia de los mamíferos que poseen el sistema fotoneuroendócrino

descrito anteriormente. En saurópsidos podemos encontrar situaciones intermedias entre ambos estadios evolutivos, lo cual avalaría la idea de un origen común entre células fotorreceptoras retinianas y pinealocitos [64]. Por otro lado la GP y la retina mantienen una gran homología en cuanto al repertorio de genes que expresan [65]; a pesar que la capacidad fotorreceptiva de la GP se ha perdido en mamíferos, muchas de las moléculas involucradas en mecanismos de fotorrecepción se siguen expresando. Además, la retina mantiene toda la maquinaria enzimática de producción de melatonina, la cual es sintetizada de manera rítmica pero en menor cantidad, por lo que se le atribuye una función local [66]. Por lo tanto, las células que conforman la GP compartirían su origen con los fotorreceptores retinianos y a pesar de que la evolución las han conducidos a destinos diferentes, no deja de ser válido establecer parámetros comparativos entre ambos órganos con el fin de hipotetizar con respecto al origen y funciones celulares [67]. El origen evolutivo particular de esta glándula la ha dotado de características únicas que han sido tal vez poco exploradas debido a la gran polarización de las investigaciones hacia su producto mejor caracterizado, la melatonina. Estudios recientes entre los cuales se pueden citar los análisis a gran escala de la expresión génica en la GP de diferentes especies, han revelado la expresión de genes considerados claves en respuestas inmuno-inflamatorias, vías de señalización de hormonas tiroideas y fotodetección, entre otros procesos [65, 68]. Estos datos involucrarían a la GP en distintos procesos fisiológicos que no han sido debidamente investigados hasta el presente.

## El sistema GABAérgico

Históricamente el ácido gamma-aminobutírico (GABA) ha sido considerado el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central (SNC). No obstante, en la actualidad es universalmente aceptado que el GABA es un neurotransmisor con funcionalidad dual; mientras su acción es inhibitoria en los circuitos neuronales del cerebro maduro, en el desarrollo y en nichos neurogénicos adultos se comporta como excitatorio [69]. Además, ya no se lo considera un transmisor exclusivo de neuronas ya que también puede ser producido, almacenado y liberado por otros tipos celulares como la glía [70-73]. También ha cambiado la apreciación de los receptores de GABA focalizados en los contactos sinápticos y activados de manera transiente o fásica por el GABA liberado de una terminal nerviosa; actualmente se suman otros subtipos de receptores que se ubican

fuera de las sinapsis y que son activados de forma tónica o persistente por el GABA ambiental o extra-sináptico [74].

El sistema GABAérgico se compone de la maquinaria molecular involucrada en la síntesis, almacenamiento, liberación, recepción y eliminación del GABA. Este neurotransmisor se genera mayoritariamente de la descarboxilación del ácido glutámico por parte de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD, del inglés *glutamic acid decarboxylase*). Han sido identificadas dos isoformas, la GAD67 (67 kDa) y la GAD65 (65 kDa), codificadas por los genes *Gad1* y *Gad2* respectivamente [75, 76]. En relación a la localización subcelular, la GAD67 es predominantemente citoplasmática y la GAD65 vesicular. Si bien la primera no posee un sitio de anclaje a membranas, se ha demostrado que minoritariamente puede asociarse a vesículas. Una de las vías de anclaje descrita es mediante la asociación con la GAD65, la cual si posee una región hidrofóbica [77]. Un mecanismo independiente de GAD65 ha sido también propuesto debido a que en ratones nulos para el gen *Gad2*, la GAD67 puede aún asociarse a membranas vesiculares [78]. El GABA producido por estas enzimas es almacenado en microvesículas con ayuda de un transportador de GABA y glicina, VIAAT (del inglés *vesicular inhibitory amino acid transporter*, también denominado VGAT, del inglés *vesicular GABA transporter*), el cual junto con las GADs son considerados marcadores de fenotipo GABAérgico. Otro componente importante del sistema GABAérgico relacionado con la finalización de la acción del GABA, son los transportadores a nivel de membrana plasmática de terminales nerviosas y en células gliales, los cuales son los encargados de la recaptación del GABA extracelular [79-81]. Al menos cuatro transportadores han sido identificados: GAT-1, GAT-2, GAT-3 y BGT-1, codificados por diferentes genes. Dichos transportadores difieren en su dependencia a iones como  $K^+$  y  $Cl^-$ , sensibilidad a inhibidores, y distribución espacial y temporal dentro del sistema nervioso. Los GAT-1-3 fueron identificados en glándula pineal, por ejemplo [82].

Por último el GABA es degradado por la enzima GABA-transaminasa (GABA-T), la cual contribuye a la homeostasis de dicho neurotransmisor y por ende, a la modulación fina del tono inhibitorio en el SNC [83]. Tanto los transportadores como la GABA-T resultan blancos terapéuticos en diversas patologías neurológicas y psiquiátricas [84, 85].

## Receptores de GABA

Se han descrito tres tipos de receptores de GABA los cuales se diferencian por su composición, mecanismos de acción, distribución espacial y temporal, así como por sus propiedades farmacológicas [86-89].

Los receptores GABA<sub>A</sub> (RGABA<sub>A</sub>) y los GABA<sub>C</sub> o ρ1 (RGABA<sub>C</sub> o RGABA<sub>ρ1</sub>) son los llamados ionotrópicos ya que forman canales, los cuales permiten el tráfico de iones a través de la membrana celular y desencadenan cambios intracelulares. Por otro lado se encuentran los receptores GABA<sub>B</sub> o metabotrópicos (RGABA<sub>B</sub>) que median un tipo de respuesta más lenta a través de su asociación con proteínas de unión a nucleótidos de guanina del tipo G<sub>i/o</sub> con efecto modulador sobre la actividad de la AC y conductancia iónica [88].

Los RGABA<sub>A</sub> son canales iónicos heteropentaméricos regulados por ligandos, selectivamente permeable a los iones cloruro (Cl<sup>-</sup>) y bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Actualmente se han descrito 16 subunidades de estos receptores (α1-6, β1-3, γ1-3, δ, ε, π y θ), que se combinan generando receptores con propiedades diferentes [90, 91]. Cada subunidad está codificada por genes distintos que a su vez sufren *splicing* alternativo por lo que el número de variantes resultantes es aún mayor. Tradicionalmente estos receptores contienen al menos una subunidad α y una β para la unión del GABA y usualmente se encuentran en la configuración 2α2β1γ [92]. La activación de RGABA<sub>A</sub> en neuronas maduras conlleva a una entrada masiva de iones cloruros a la célula desde el medio extracelular y por ende, a una hiperpolarización de la membrana y una mayor resistencia a propagar un impulso nervioso. En este mecanismo de acción se basa la acción inhibitoria del GABA en el SNC, fundamental para la modulación de la excitabilidad neuronal. Sin embargo, con el avance de las investigaciones y la tecnología se ha llegado a aceptar que el GABA ejerce un efecto depolarizante en progenitores neuronales y en células gliales como astrocitos [72, 93, 94].

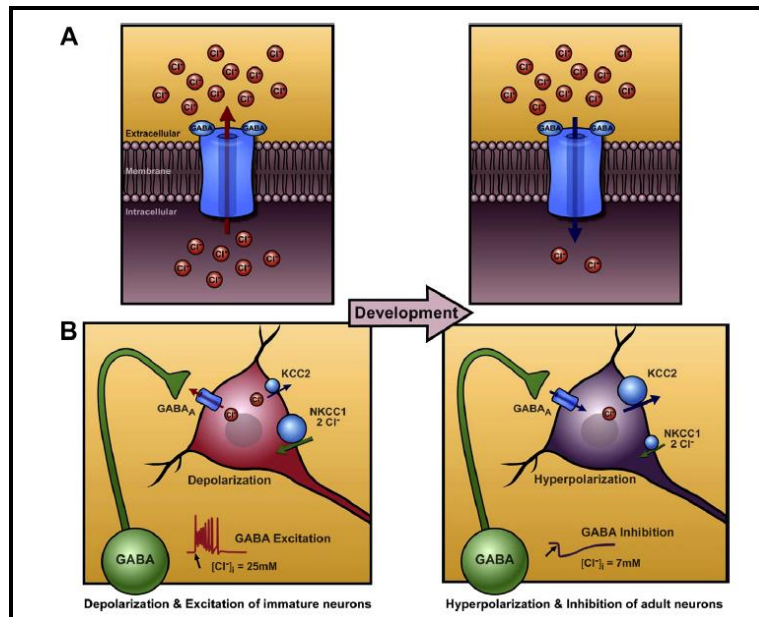
Los RGABA<sub>B</sub> están conformados principalmente por dos subunidades, GABA<sub>B1</sub> y GABA<sub>B2</sub>, codificadas por genes independientes [95]. Dicha heterodimerización es fundamental para la funcionalidad del receptor [88, 96, 97]. Mientras la subunidad GABA<sub>B1</sub> contiene el sitio de unión al GABA, GABA<sub>B2</sub> es responsable de la interacción



con la proteína heterotrimérica G [98]. Se han descrito dos isoformas para la subunidad  $GABA_B1$ ,  $GABA_B1\alpha$  y  $GABA_B1\beta$ , que difieren en un par de dominios en el extremo N-terminal, y aunque tienen propiedades farmacológicas similares se diferencian en su regulación, distribución y función pre- y/o post-sináptica [95]. Además de su actividad inhibitoria en la sinapsis adulta, estos receptores han sido involucrados en el desarrollo del sistema nervioso. Los  $RGABA_B$  modularían la motilidad y migración de las células embrionarias corticales [99] y el movimiento celular en el núcleo ventro-medial del hipotálamo [100]. Agonistas de los  $RGABA_B$  estimularían la migración, mientras que los antagonistas la inhibirían [100]. Estos receptores presentan una distribución amplia y dinámica en el SNC en desarrollo y aparentemente median la acción del GABA como factor trófico [101].

## Acción depolarizante del GABA y su impacto en la biología del sistema nervioso

La depolarización inducida por el GABA en neuronas inmaduras se produciría debida a que el contenido de cloruro intracelular en ellas se mantiene más elevado mediante bombas activas que lo incorporan del medio extracelular. De esta manera al abrirse los canales de los receptores, la difusión de iones es hacia el exterior celular, disminuyendo la carga negativa intracelular y depolarizando la membrana [102]. Esta diferencia en el desarrollo es atribuida a la expresión diferencial de dos co-transportadores, el de  $Na^+-K^+-2Cl^-$  (NKCC1) que impulsa al  $Cl^-$  dentro del citoplasma; y el de  $K^+-Cl^-$  (KCC2) que lo exterioriza (FIG. 4). En ratones, los NKCC1 son más abundantes en las etapas más tempranas del desarrollo, mientras que a partir de la segunda semana de vida aumenta la expresión de los KCC2 en las neuronas maduras manifestándose el comportamiento hiperpolarizante del GABA [103-106].



**FIG. 4: Expresión diferencial de los co-transportadores de Cl<sup>-</sup> en función del grado de maduración neuronal.**

A) En los recuadros superiores se grafica la dirección del flujo de Cl<sup>-</sup> en función de su concentración. B) En la parte inferior están representados los perfiles depolarizante e hiperpolarizante por salida y entrada de Cl<sup>-</sup> respectivamente. La abundancia de los co-transportadores está representada por esferas azules de diferentes tamaños. Extraído de Ben-Ari Y. 2007 [102].

La depolarización mediada por GABA tendría un rol muy importante en la diferenciación celular, donde el neurotransmisor actuaría como un factor trófico. Se lo ha involucrado en procesos como quiescencia, neurogénesis y sinaptogénesis, interviniendo mediante la modulación de segundos mensajeros [103, 107] y la regulación de la síntesis del ADN [108]. Es bien conocido que las diferentes subunidades del RGABA<sub>A</sub> se regulan diferencialmente en el desarrollo del cerebro, generando distribuciones regionales que varían en el tiempo. Este aspecto es fundamental para las propiedades funcionales de la señalización mediada por GABA [109]. Ciertas subunidades se han visto que son más abundantes en estadios tempranos del desarrollo como las  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 5$  [110, 111]. Por su parte, la expresión de la subunidad  $\alpha 1$  es baja al nacer, pero aumenta significativamente durante la primera semana de desarrollo, mientras que la  $\alpha 2$  disminuye [112]. La importancia de un sistema GABAérgico intacto durante el desarrollo ha sido demostrada mediante múltiples experimentos de ablación génica [113-115].

El GABA también tendría un rol importante en la neurogénesis adulta. En neuronas inmaduras del hipocampo, la señalización GABAérgica produce un aumento del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular y la expresión del factor de diferenciación neuronal NeuroD1 [94]. En los neuroblastos de la zona subgranular del giro dentado hipocampal y en la zona subventricular de los ventrículos laterales, el GABA funciona como un factor externo que regula la división, migración, diferenciación e integración de estas células a través de múltiples subunidades de los receptores  $\text{GABA}_A$  y  $\text{GABA}_B$  [94, 116]. Datos recientes obtenidos por Giachino y cols. [117] mediante el uso de inhibidores específicos y por ablación génica, indican que el GABA actuaría como inhibidor de la proliferación en precursores neuronales hipocampales mediante de la actividad de los  $\text{RGABA}_B$ .

También en astrocitos del hipocampo, el GABA produce un aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular vía la activación de los  $\text{RGABA}_A$  y los  $\text{RGABA}_B$ . La activación de los  $\text{RGABA}_A$  produce un rápido aumento del  $\text{Ca}^{+2}$  mediante el influjo extracelular a través de los canales dependientes de voltaje. Por su parte, la activación de los  $\text{RGABA}_B$  induce un aumento más lento de  $\text{Ca}^{+2}$  ya que involucra la activación de proteínas G heterotriméricas y la generación de inositol trifosfato (IP3), desencadenando el vaciamiento de los reservorios intracelulares. También se determinó que este comportamiento de los receptores presenta un claro perfil durante el desarrollo, tornándose más robusto a medida que se establecen las redes neuronales del adulto [118]. Esta vía tendría un rol fundamental en la interacción glía-neuronas.

## GABA está involucrado en la regulación del flujo sanguíneo

Otra función interesante del GABA en el SNC es el efecto que tendría en la regulación del flujo sanguíneo. El aumento de la actividad neuronal en una región determinada produce un aumento en el flujo sanguíneo asociado posiblemente a suplir un incremento en el consumo energético del área. Las arteriolas precapilares han sido consideradas claves en dicho fenómeno por la presencia de musculatura lisa en sus paredes [119, 120]. Sin embargo, algunos estudios algo controversiales proponen que los pericitos, células pericapilares especializadas con capacidad contráctil, también tendrían una participación activa en la regulación de la microcirculación en el SNC, siendo el GABA uno de los moduladores de su comportamiento por interacción con receptores específicos

[121]. El GABA también ha sido asociado a la regulación vascular fuera del SNC vía receptores ionotrópicos y segundos mensajeros como el ON [122-125].

## Farmacología del sistema GABAérgico

La composición diferencial de subunidades en los subtipos de RGABA<sub>A</sub> es finalmente determinante en la localización particular de los mismos con respecto a una sinapsis, de sus diversas respuestas tónicas o fásicas y de sus características farmacológicas específicas, entre otras propiedades. Dicha complejidad ha llevado a la búsqueda de agonistas, antagonistas y reguladores alostéricos y ortostéricos con la mayor selectividad, que faciliten el estudio de la fisiología y farmacología de cada subtipo de receptor y también con fines terapéuticos [92, 126]. En el presente trabajo de Tesis se procedió a la manipulación de los RGABA<sub>A</sub> mediante el uso del agonista muscimol (MUS) y del antagonista bicuculina (BIC) [127, 128].

El conocimiento de la farmacología y el potencial terapéutico de los RGABA<sub>B</sub> también ha evolucionado enormemente, siendo el baclofeno uno de los agonistas mayormente elegidos, mientras el saclofeno juega un rol antagónico del GABA vía dichos receptores [129-132]. Finalmente, la farmacología de los RGABA<sub>C</sub> ha sido la más rezagada en parte por la menor distribución de dichos receptores en el sistema nervioso y por ende, por un número más reducido de funciones mediadas por los mismos [133].

## Sistema GABAérgico en la glándula pineal: influencia del GABA en la biología glandular.

Si bien ha sido propuesto un rol del GABA sobre la biología de la GP, existen controversias sobre la identidad y distribución celular de los componentes del sistema GABAérgico y su funcionalidad en dicho órgano. Más aun, nada se sabe sobre el rol ontogenético de dicho transmisor en la GP. La finalidad del presente trabajo de Tesis es aportar elementos que permitan avanzar en esta problemática.

Dentro de los primeros estudios en roedores figura el de Schon y cols. [134], quienes mediante la administración *in vivo* e *in vitro* de GABA tritiado, identificaron a las células

gliales de la GP como las responsables de la recaptación del transmisor, mientras que los pinealocitos y terminales simpáticas no incorporaron la marca. Los mismos autores mostraron evidencias de la existencia de GABA endógeno en la GP, como así también de las enzimas involucradas en su metabolismo, GAD y GABA-T. También sugirieron que la glía pineal modularía los niveles de GABA circulante mediante su internalización y prácticamente negaron el impacto del mismo en la actividad secretoria de los pinealocitos. Siguiendo una línea similar de pensamiento, Mata y cols. [135] concluyeron que tanto la actividad de la GAD como el contenido de GABA en la GP no serían influenciados por la luz ambiental, ni por la inervación simpática o central. Pudieron detectar actividad de la GAD aun en pineales aisladas cultivadas por 48hs, lo que indicaría que, al menos en parte, el GABA podría sintetizarse a nivel de estructuras intraglandulares y no en neuronas externas que proyectan hacia la GP. Además, mediante experimentos *in vitro* de administración de GABA o de BIC (antagonista de los  $RGABA_A$ ) no lograron modificar de manera significativa la actividad de la enzima AANAT, tanto a nivel basal como después de la estimulación con NA. También experimentaron con cultivos de corto tiempo que mantienen funcional su inervación y no observaron un efecto de GABA o BIC sobre la actividad de la AANAT, por lo que infieren que no estaría afectada la liberación de NA por parte de las terminales nerviosas remanentes. Con estos resultados los autores concluyen que el GABA no tendría función moduladora pre ni post-sináptica sobre la actividad de la AANAT estimulada por NA.

Waniewski y Suria [136] realizaron mediciones del contenido de GABA mediante HPLC (del inglés *high-performance liquid chromatography*) en GP y en el ganglio cervical superior (GCS) en ensayos *in vivo*. Inyectaron de forma intraperitoneal isoproterenol, un agonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y no observaron variaciones a nivel del contenido de GABA en la GP, aunque si en los GCS. También realizaron mediciones del contenido de GABA en la GP de animales GCSx y no se vio un cambio significativo, lo que indicaría cierta independencia de la inervación simpática. Sin embargo determinaron mediante GABA tritiado, que la re-captación de GABA por parte de las células gliales estaba significativamente reducida en las pineales de animales GCSx, los autores sugieren que existe una relación funcional entre la glía y las terminales nerviosas que inervan la GP. Por el contrario, las publicaciones a cargo de Edabi y cols. [137, 138] y Balemans y cols. [139] presentaron al GABA como un regulador de la síntesis de melatonina vía interacción final con la enzima AANAT. Los autores del segundo trabajo concluyeron que el GABA

provocaría un incremento, una disminución o no tendría efecto sobre la síntesis de compuestos N-acetilados radiactivos dependiendo del momento de administración del transmisor radiomarcado y de la presencia simultánea o no de dadores de grupos acetilos. Al mismo tiempo por ensayos de unión proponen la participación de sitios tipo receptores en la GP.

A finales de la década de los ochenta y comienzos la de los noventa, con la ventaja de los avances en la farmacología de los receptores de GABA y NA, Rosenstein y cols. [140-142] reafirman la presencia de un sistema GABAérgico intrínseco en la GP de rata y su interacción con la maquinaria biosintética de melatonina. Mediante experimentos *in vitro* y el uso de agonistas y antagonistas específicos, dichos autores mostraron: 1.- la existencia de una fuente endógena de GABA en la GP, 2.- que la liberación de GABA tritiado al medio de cultivo en concentraciones depolarizantes de  $K^+$  es dependiente de  $Ca^{+2}$  y responde de manera dosis-dependiente a la NA y 3.- que ese efecto noradrenérgico sobre la liberación del GABA sería mediado en mayor medida por receptores del tipo  $AdR\alpha1$ . Estos resultados sugerían la existencia de GABA vesicular capaz de ser liberado ante un estímulo. El mismo grupo generó evidencias de que el GABA inhibiría la producción de melatonina inducida por NA vía  $RGABA_A$  y no  $RGABA_B$ , y que esa inhibición tendría lugar en un nivel posterior a la generación de serotonina en la cascada enzimática [140]. En un trabajo posterior, Rosenstein y cols. [141] encuentran que la acción moduladora del GABA sobre melatonina se extendería a nivel de las terminales simpáticas que arriban a la GP desde los GCS, por impacto sobre  $RGABA_A$  y  $RGABA_B$  a nivel presináptico; contradiciendo de esta manera los resultados obtenidos anteriormente por Mata y cols. [135]. Frente a este escenario de controversia y a la complejidad del sistema GABAérgico surge con más fuerza la necesidad de particionar a sus elementos en el parénquima y/o intersticio glandular con el fin de alcanzar un mayor entendimiento de los mecanismos involucrados.

Los datos existentes sobre la localización de los componentes del sistema GABAérgico en la GP también son contradictorios. En GP de gerbo se detectaron mediante IHQ tres transportadores de GABA, GAT1, 2 y 3 tanto en pinealocitos como en células intersticiales y se encontró a la GAD67 co-localizando con marcadores específicos del fenotipo pinealocítico [82]. Por otro lado, Echigo y Moriyama observaron en cultivos de GP de rata, que el transportador VIAAT se expresa en una subpoblación de astrocitos

GFAP (proteína ácida fibrilar glial) positivos y en una subpoblación de microglía OX42 positiva pero no en pinealocitos [143].

El rol del ácido gamma-aminobutírico (GABA) en la GP ha sido extensivamente analizado, sin embargo hay varios puntos débiles en la bibliografía, algunos de los cuales han sido abordados en el transcurso de esta Tesis. Si bien el efecto del GABA sobre la melatonina ha sido documentado, todos los ensayos fueron realizados *in vitro*. Por otro lado, varios trabajos en GP de diferentes especies apoyan la existencia de células GABAérgicas en la misma, aunque no logran una caracterización fina de los tipos celulares ni los mecanismos moleculares implicados. Desde el punto de vista funcional, no existe bibliografía que permita discriminar entre el rol del GABA proveniente de células propias de la glándula y el de terminales GABAérgicos que llegan a ella. Por último, nada se sabe sobre la existencia, localización y roles los componentes del sistema GABAérgico durante la ontogenia de la GP.

## Características y función del sistema glutamatérgico intrínseco de la glándula pineal

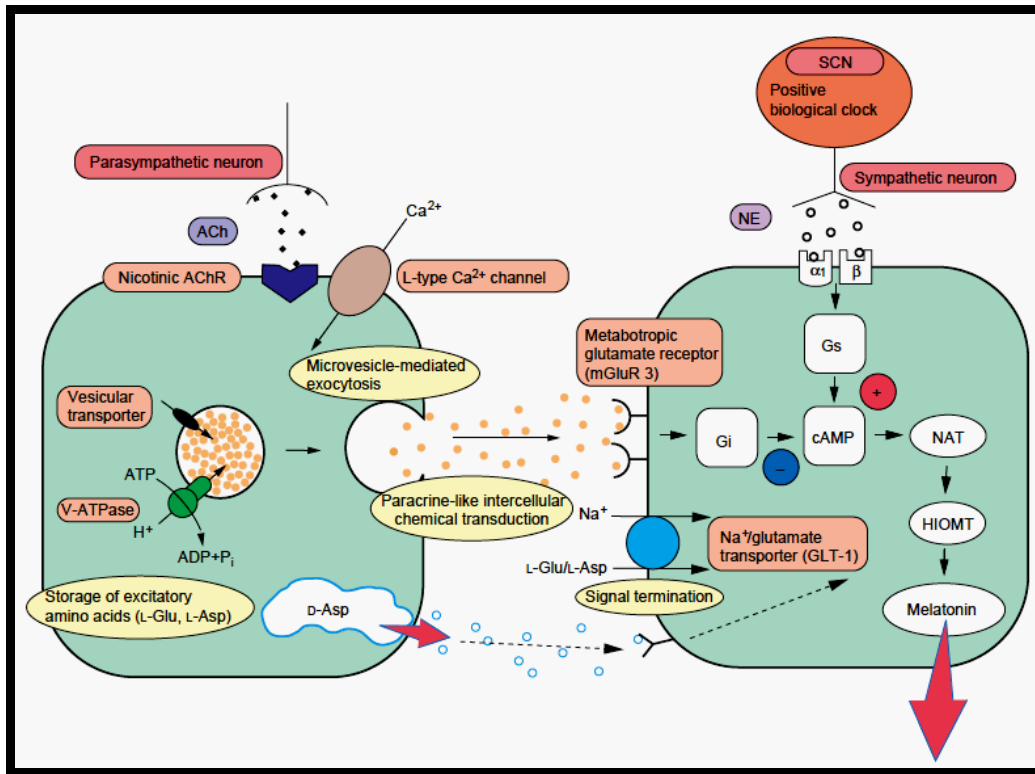
Estudios estructurales y funcionales en la GP de bovino y rata, describen vesículas tipo sinápticas con contenido de L-glutamato y L-aspartato en los pinealocitos [144, 145]. También ha sido encontrado abundante D-aspartato en el citoplasma de los mismos, que es liberado en forma gradual por un sistema distinto a la liberación regulada de microvesículas [146]. Tanto en las células fotorreceptoras de la retina como en los pinealocitos, se han detectado formas sinápticas distintivas, que consisten en estructuras presinápticas especializadas para la liberación continua de neurotransmisores, denominadas sinapsis en banda (del inglés *ribbon synapses*) [147-149]. Este tipo de sinapsis facilita la liberación de multivesículas y muestra un ritmo circadiano marcado por un incremento de estas estructuras en la fase nocturna paralelamente a la melatonina pero con una regulación diferente [149]. En retina estas vesículas contienen glutamato entre otros neurotransmisores y aunque su liberación es tónica o constante, su caudal está modulado por cambios en el potencial de membrana [147].

Las dos isoformas del transportador vesicular de glutamato VGLUT1 y VGLUT2 (del inglés *vesicular glutamate transporter 1* y *2*, respectivamente) fueron descritas co-localizando y asociadas a microvesículas, en la mayoría de los pinealocitos en GP de rata [150]. También se observó que los niveles del ARNm y la proteína VGLUT2, pero no VGLUT1, son mayores durante la noche que en el día; y que esta diferencia se mantiene en condiciones de oscuridad constante y es atenuada en luz constante [151, 152]. Esta variación diaria podría implicar algún tipo de función en la regulación de la melatonina. En el desarrollo posnatal de la GP existe expresión diferencial de las isoformas de VGLUT lo que presumiblemente tendría implicancia en diferentes funciones fisiológicas de la señalización glutamatérgica. VGLUT2 se expresa con mayor intensidad alrededor de la fecha de nacimiento y disminuye gradualmente en los siguientes días posnatales; a partir de P7 comienza a predominar VGLUT1 que aumenta su expresión a medida que madura la GP [151]. Una variante de la isoforma VGLUT1 producto de *splicing* alternativo, VGLUT1v, fue detectada casi exclusivamente en células fotorreceptoras de la retina y en GP, representando el 75% y el 25% del ARNm total de VGLUT1 en ambos sitios, respectivamente. Además la expresión de esta variante se vio diferencialmente regulada en el desarrollo de estos órganos [153].

En cuanto a la intervención del glutamato en la vía de síntesis de melatonina, Govitrapong y Ebadi [154] encuentran los primeros indicios de un rol modulador. Más adelante Kus y cols. [155] con ensayos de superfusión y Yamada y cols. [156] en cultivos neonatales, confirman el poder inhibitorio del glutamato sobre la síntesis de melatonina inducida por NA. También se determinó mediante el uso de agonistas específicos, que la inhibición manifestada por el glutamato sobre la síntesis de melatonina es exclusivamente vía receptores metabotrópicos de clase II y no otros tipos de receptores; y su efecto aparentemente involucra la vía del AMPc. Se ha identificado en pinealocitos al mGLUR3 (del inglés *metabotropic glutamate receptors 3*) y a las proteínas G<sub>i</sub> (del inglés *inhibitory guanine nucleotide-binding protein*) asociadas [157]. Sin embargo, se observó la expresión del receptor metabotrópico de clase I mGLUR5 y se comprobó su actividad en cultivos de pinealocitos aunque no se sabe su rol fisiológico [158]. También se localizó al GLUR1 (del inglés *ionotropic glutamate receptor 1*) en pinealocitos y su activación induciría la apertura de canales de Ca<sup>+2</sup> de tipo L y la exocitosis de microvesículas cargadas de L-glutamato [159].



En una revisión de Moriyama y cols. [160] se presenta un modelo de la regulación de la síntesis de melatonina en la GP por un sistema glutamatérgicos intrínseco (FIG. 5).



**FIG. 5: Regulación de la síntesis de melatonina por el sistema glutamatérgico.**

El esquema muestra dos pinealocitos que interactúan en forma paracrina mediante el L-glutamato y el D-aspartato, los que impactan en sus respectivos receptores de membrana disminuyendo los niveles de AMPc e inhibiendo la síntesis de melatonina inducida por el impulso de NA nocturno. Extraído de Moriyama y cols., 2000 [160].

## Factores de transcripción involucrados en el desarrollo de la glándula pineal

En los últimos años, múltiples familias de factores de transcripción han sido involucradas en el establecimiento y mantenimiento del fenotipo pineal. Entre dichos reguladores de la transcripción se encuentran los codificados por los genes homeóticos que trabajan de manera orquestada durante el desarrollo y la vida adulta de la GP de roedores [161]. Pax6, Otx2 y Lhx (del inglés *paired box 6*, *orthodenticle 2*, y *LIM homeobox*,

respectivamente) son esenciales para el desarrollo de la GP [162-166], a diferencia de *Crx* (del inglés *Cone-rod homeobox*) que se encontró que no es fundamental para su desarrollo pero aun así mediaría la expresión génica tejido-específica [167-169]. Otra familia que ha sido identificada en la GP es la de los bHLH (del inglés *basic helix-loop-helix*) [41, 170, 171]. Los miembros de esta familia son de especial interés debido a su rol en la generación y mantenimiento de las oscilaciones circadianas. Brevemente, el dímero CLOCK:BMAL1, interactúa con las secuencias consenso *E-boxes* ubicadas en la región regulatoria de genes reloj y genes controlados por el reloj, y los productos de estos genes vuelven sobre sus propias regiones regulatorias inhibiendo su transcripción, generando así mecanismos de retroalimentación negativos claves en la génesis de oscilaciones [172-174]. A continuación profundizaremos en aquellos factores de transcripción que fueron analizados en el presente trabajo de Tesis.

## Pax6

El gen homeótico *Pax6* es un factor de transcripción que ha sido asociado al desarrollo del ojo en todo el reino animal, se lo considera el gen maestro del ojo ya que en su ausencia no se desarrolla, mientras que su expresión ectópica produce la formación de estructuras ópticas en los tejidos afectados [175]. Además, presenta un extenso patrón de expresión en todo el sistema nervioso [176] y se lo detecta muy temprano en el desarrollo del órgano subcomisural y la GP [162]. El silenciamiento del gen *Pax6* tiene como consecuencia la ausencia de la GP, por lo cual se puede deducir que este factor resulta imprescindible para el desarrollo de este órgano, y que sus funciones biológicas no pueden ser reemplazadas por otra proteína de la familia.

Un dato interesante aportado por Rath y cols. [161, 177], es que en el adulto la expresión de *Pax6* persiste en células de la retina profunda al igual que en la GP, por lo que podría tratarse de precursores relativamente indiferenciados. En el desarrollo de la retina de anfibios y peces, las células que forman este órgano se originan en una región llamada zona marginal ciliar (ZMC). Este nicho neurogénico se ubica en la periferia de la retina y presenta una estructura celular ordenada en función de su desarrollo y diferenciación. Las células que se ubican en la capa más periférica son las más jóvenes y tienen características de células madres (estas células mantendrían la expresión de *Pax6*); las de la capa media

son proliferativas y las más internas serían las más diferenciadas [178, 179]. La ZMC en vertebrados inferiores permanece activa en el adulto, lo que permite la regeneración de las células retinianas en toda la vida del organismo [180-183]. Por su parte, en la retina adulta de vertebrados superiores, esta región neurogénica no existe, aunque hay evidencia de células progenitoras que podrían derivar de los cuerpos pigmentarios ciliares, posiblemente reflejando homología evolutiva con dicha región [184-186]. En nuestro laboratorio hemos confirmado la existencia de células Pax6-positivas en la GP adulta (datos no publicados generados por M.P. Ibáñez Rodríguez, Ver Capítulo II de resultados).

Recientemente Pax6 ha sido involucrado en la diferenciación de neuronas del tálamo, promoviendo el fenotipo glutamatérgico del tálamo caudal por sobre el fenotipo GABAérgico de la región rostral (rTh del inglés *rostral thalamus*). Un dato interesante de este trabajo es que la eliminación de la expresión de Pax6 no es suficiente para inducir la diferenciación GABAérgica, lo cual indica que otros genes como por ejemplo *sonic hedgehog* son necesarios para la inducción del fenotipo rTh [187, 188]. Hevner y cols. [187] posicionan a Pax6 dentro de lo que ellos consideran un conservado programa de expresión de factores de transcripción que determina el fenotipo glutamatérgico en neuronas piramidales del giro dentado del hipocampo y en el cerebelo. Dentro de estos factores de transcripción ellos identifican a Pax6, Tbr2/Eomes, NeuroD y Tbr1 que se expresan secuencialmente durante el desarrollo de estas neuronas.

## NeuroD1

El factor de diferenciación neuronal NeuroD1/BETA2 es un factor de transcripción de la familia de los bHLH que ejerce un rol clave en el desarrollo del sistema nervioso y el páncreas [189, 190]. En rata, el ARNm del NeuroD1 fue observado a partir del día 17 de gestación (E17), a unas 48 horas de iniciado el esbozo de la glándula pineal [191]. En la última publicación de nuestro grupo se describió la expresión y localización celular de la proteína a través del desarrollo de la GP y sus variaciones diarias. En la vida embrionaria y perinatal la proteína siguió el mismo patrón que el ARNm y su localización fue principalmente nuclear. A partir de P10 hasta el adulto, NeuroD1 se localiza principalmente el núcleo de los pinealocitos durante la noche, en cambio durante el día su localización es mayormente citoplasmática. Además, se comprobó que los niveles de

localización nuclear nocturna disminuían por interrupción de la inervación simpática o con la administración de drogas bloqueantes de los  $\alpha$  y  $\beta$  adrenoreceptores [192]. La hipótesis elaborada por Muñoz y colaboradores establece que el NeuroD1 sería un regulador clave en la definición y mantenimiento del fenotipo pineal, *vía* modulación de funciones específicas como el ritmo circadiano de melatonina. Esta hipótesis es avalada por estudios de expresión génica en GP provenientes de dos líneas independientes de ratones, una knock-out (KO) total y otra condicional del tipo Cre-LoxP para el NeuroD1, así como del dinamismo detectado para la proteína en el adulto [191, 193]. La línea de ratón KO condicional tiene suprimida la expresión del gen *NeuroD1* en retina y GP, y la delección génica es dirigida el promotor del *Crx* que se activa relativamente tarde en la ontogenia glandular. Estos ratones muestran una estructura retiniana notoriamente afectada, sin embargo la GP está relativamente preservada desde el punto de vista morfológico. NeuroD1 es esencial para el desarrollo de los fotorreceptores retinianos, mientras que los pinealocitos sobreviven pero con un transcriptoma afectado como lo evidencia el análisis por *microarray* en ambos órganos [193]

Por otro lado, el análisis por *microarray* de las GP provenientes de ratones neonatales (P0) nulos totales para NeuroD1, reveló un incremento significativo en la expresión del gen *Gad1* [191]. Por el contrario, en el modelo de ratón KO condicional para *NeuroD1*, no se observó esta sobreexpresión de *Gad1* aunque algunas subunidades del RGABA<sub>A</sub> como las  $\alpha 4$  y  $\beta 1$ , codificadas por *Gabra4* y *Gabrb1* respectivamente, si estaban afectadas [193]. Estos datos nos llevaron a preguntarnos por la relación que podría existir entre este factor de transcripción y el sistema GABAérgico. El hecho que el gen *Gad1* es uno de los más afectados en la glándula pineal en ausencia del NeuroD1, sugiere que dicho gen podría ser reprimido directa o indirectamente por este bHLH. El análisis del promotor del gen *Gad1* reveló la presencia de secuencias *E-boxes* compatibles con el sitio consenso del NeuroD1 [194, 195].

Roybon y cols. [196] demostraron recientemente que NeuroD1 juega un rol de tipo bisagra, facilitando la diferenciación de neuronas glutamatérgicas sobre el fenotipo GABAérgico, probablemente *vía* la represión de *Ascl1* (del inglés *achaete/scute family 1*, también conocido como *Mash1*, del inglés *mammalian achaete scute homolog-1*). La supresión de este factor bHLH es necesaria en corteza para evitar la formación de neuronas GABAérgicas, y esta acción inhibitoria es atribuida a proteínas miembros de la misma

familia. Se demostró mediante experimentos de expresión ectópica y ablación génica, que Neurogenina 2 (Ngn2) y los efectores río abajo, NeuroD1 y NeuroD2 pueden abolir la diferenciación de neuronas GABAérgicas dirigidas por Mash1. La expresión ectópica de cualquiera de estos genes inhibe a Mash1 en células que lo expresan, sin afectar la expresión del gen homeótico *distal less*, lo que resulta en la completa pérdida del fenotipo GABAérgico [196]. Experimentos en retina de *Xenopus* con proteínas quiméricas revelaron un aspecto muy interesante sobre esta familia de factores de transcripción. Mazurier cols. [197] produjeron quimeras entre Ngn2 y Mash1 intercambiando sus regiones básicas de interacción con el ADN. La quimera Ngn2 con el sitio de unión de Mash1 indujo diferenciación GABAérgica y lo inverso obtuvieron con la quimera que combina a Mash1 con la región básica de Ngn2, la cual condujo a la diferenciación glutamatérgica. Estos experimentos demuestran que el sitio de unión al ADN de estos factores de transcripción es lo que determina su funcionalidad y efecto sobre el fenotipo celular.

Al igual que la retina, el desarrollo del cerebelo se ve severamente afectado en los ratones KO para NeuroD1 [190, 198]. Las células cerebelares expresan este factor de transcripción desde muy temprano en el desarrollo hasta la vida adulta. El hecho que el cerebelo sea un órgano altamente organizado y que su desarrollo transcurra aún en estadios postnatales, junto a la vasta bibliografía existente, hacen de este órgano un modelo de estudio interesante para confrontar nuestras hipótesis [199-201]. Existen 5 poblaciones celulares bien definidas en cerebelo de mamífero. Las células granulares de naturaleza glutamatérgica son las más abundantes y se agrupan formando la capa granular (CG). Estas células se originan del labio róbico y migran tangencialmente por la superficie del primordio cerebelar formando la capa granular externa (CGE) que luego mediante la migración radial de sus células, dará origen a la capa granular interna (CGI) [202, 203]. Por otro lado se encuentran las células de naturaleza GABAérgica que se delaminan/desprenden del neuroepitelio ventricular, migran y proliferan en la sustancia blanca dando origen a las de Purkinje y las de Golgi II, y las interneuronas de la capa molecular (CM) denominadas estelares y en cesto [204, 205]. Además de los tipos celulares clásicos que nombramos, se sabe que existe un tipo de interneurona glutamatérgica que se ubica en la CG denominada célula unipolar en cepillo (*brush cell*) o célula monopolar del cerebelo [206]. Se ha involucrado a estas neuronas en varios procesos

de aprendizaje, memoria y coordinación, lo que genera un creciente interés por ellas [207, 208].

## Proteínas Id

Las proteínas Id (del inglés *inhibitor of differentiation*) son miembros de la familia de los factores de transcripción HLH que funcionan como dominantes negativos de los bHLH. A las Ids les falta el dominio básico de unión al ADN, pero si tienen la capacidad de dimerizar con los factores bHLH. De esta manera secuestran factores de transcripción formando un dímero transcripcionalmente inactivo. Las proteínas Id-1 e Id-3 fueron localizadas mediante IHQ en pinealocitos, pero solo Id-1 presentó un alto nivel de expresión y localización citoplasmática en una subpoblación de células vimentina (VIM)/S-100 $\beta$  (del inglés *S100 calcium binding protein B*) positivas y GFAP/OX42 negativas [209]. La glándula pineal es el único órgano reportado del sistema nervioso donde se mantienen estas células VIM positivas, GFAP negativas en el adulto. Kofler y cols. [209] sugieren que Id-1 posiblemente tiene un rol en el establecimiento y mantenimiento de esta particular población de células de la glándula. Este factor también ha sido involucrado en la biología circadiana de la GP ya que presenta una regulación día/noche diferencial, siendo los niveles nocturnos seis veces mayores que los diurnos, lo cual no sucede con Id-2 ni Id-3 [210]. Estos datos posicionan a Id-1 como un factor importante en la diferenciación y el funcionamiento rítmico de la GP.

## Egr1

Otro factor de transcripción que ha sido implicado en la regulación circadiana de la glándula pineal es codificado por el gen de respuesta temprana *egr1* (del inglés *early growth response 1*). Su expresión en la glándula pineal de rata se restringe a los núcleos de una subpoblación de células con morfología glial que expresan los marcadores VIM y S-100 $\beta$  y representan aproximadamente el 6% de la población celular de la glándula [211]. Además, se demostró que este factor de transcripción regula la expresión del gen *Gad1* en otros sistemas [212] y se identificaron secuencias EREs (del inglés *Egr-response elements*) en el sitio promotor de dicho gen [194, 213]. En el desarrollo de las neuronas hipocámpales, el factor de transcripción Egr1 se posa sobre el promotor del gen *Gad1*

induciendo su expresión, con el consecuente aumento de la enzima y los contenidos de GABA en las neuritas promoviendo la maduración de las neuronas GABAérgicas [212]. Por otro lado, la expresión de Id-1 depende de Egr1, comprobándose la unión efectiva de este factor de transcripción al sitio promotor del primero [214].

## HIPÓTESIS GENERAL

La hipótesis general de este trabajo de Tesis es que el sistema GABAérgico tiene influencia en la ontogenia de la glándula pineal y en la regulación de su fisiología en la rata adulta. Además, que la diferenciación de la población celular GABAérgica propia de la GP requiere de la inhibición de la actividad del factor de transcripción NeuroD1.

## OBJETIVO GENERAL

Nuestro objetivo principal fue definir el rol del sistema GABAérgico durante el desarrollo y en la fisiología de la GP adulta, así como su potencial relación con el factor de diferenciación NeuroD1.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar la ontogenia del sistema GABAérgico en la GP de rata. Este objetivo incluye la detección de moléculas involucradas en la síntesis y recepción del GABA.
- 2) Detectar y darle identidad celular a los componentes del sistema GABAérgico en la GP adulta.
- 3) Analizar la relación entre los marcadores GABAérgicos y la localización celular de NeuroD1 en relación al posible rol inhibitorio de este factor de transcripción sobre el fenotipo GABAérgico.
- 4) Analizar la función de GABA sobre la síntesis de melatonina mediante experimentos *in vivo* e *in vitro*.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## Animales utilizados

Para todos los experimentos realizados en este trabajo de Tesis fueron utilizadas ratas de la cepa Wistar, las cuales fueron mantenidas bajo un ciclo luz-oscuridad (L:O) de 12:12, con libre acceso al alimento balanceado y al agua. El encendido de las luces tiene lugar a la 7am y se lo considera como el ZT0. Todos los experimentos y tratamientos practicados a los animales fueron previamente evaluados y aprobados por el Comité Local para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo, Mendoza, y de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de USA.

Para los estudios realizados durante el desarrollo embrionario (E), se obtuvieron embriones de ambos sexos a partir de ratas Wistar preñadas. Las hembras adultas cicladas [215], fueron enfrentadas con un macho fértil durante el proestro, con el fin de incrementar la tasa de fecundación exitosa durante el estro. Al día siguiente del potencial apareamiento se procedió a la búsqueda del tapón vaginal y/o de espermatozoides en el tracto genital de la hembra. Se designó día 0 de gestación al momento de la confirmación de dichos signos, y a partir de allí se obtuvieron muestras a diferentes días de gestación. Debido al pequeño tamaño de los embriones a E15, éstos se procesaron enteros, y fueron fijados por inmersión en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS (*phosphate buffered saline*, pH 7.3) por dos días a 4°C. A E16, se realizó el mismo procedimiento pero con las cabezas únicamente. A partir de E17, los embriones fueron liberados uno por uno de la cavidad uterina y separados de la placenta por corte del cordón umbilical. Los embriones fueron fijados bajo lupa por perfusión transcardíaca con PFA al 4% después del lavado con solución salina al 0.9%, los cerebros fueron disecados cuidadosamente con el fin de mantener a la GP *in situ* y post-fijados en la misma solución por 1 a 2 días a 4°C. Para el estudio en estadios postnatales (P), se utilizaron crías de ambos sexos. Los neonatos fueron anestesiados por hipotermia o mediante inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina (50 mg y 5 mg por kilogramo de peso corporal, respectivamente) [216], y sometidos al mismo procedimiento descrito para embriones avanzados.

En cuanto a los estudios a nivel de la GP adulta, se utilizaron ratas Wistar machos de alrededor de 90 días, las cuales fueron sacrificadas por decapitación, previa anestesia

con ketamina/xilacina. Las muestras fueron recogidas en la fase de luz ZT6 (medio día) y en la fase nocturna bajo una luz roja tenue a ZT14 (noche temprana), ZT18 (media noche) y ZT22 (noche tardía). Estas muestras se destinaron para inmunohistoquímica (IHQ), *western blot* (WB), hibridación *in situ* (HIS), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, del inglés *high-performance liquid chromatography*) y para la técnica de transcripción inversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa (en inglés *reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR).

## Remoción de los ganglios cervicales superiores (GCSx)

Ratas machos adultos fueron sometidas a la remoción bilateral de los ganglios cervicales superiores (GCSx) siguiendo el protocolo desarrollado en nuestro laboratorio y publicado por Savastano y cols. [216]. A continuación se describe brevemente el procedimiento. Una vez anestesiados con ketamina/xilacina, los animales fueron colocados en posición decúbito dorsal, se procedió a afeitar cuidadosamente la zona del cuello y a su posterior desinfección con una solución al 5% de cloruro de benzalconio. Se realizó a una incisión vertical de aproximadamente 2.5 cm de longitud, de manera que las glándulas salivales fueran expuestas y retraídas con el fin de descubrir los músculos adyacentes. La bifurcación de la arteria carótida común fue identificada a ambos lados de la línea media y a nivel de un área anatómica conocida como triángulo carotídeo. A continuación los GCS fueron identificados y removidos por corte de los troncos simpáticos y los nervios carotídeos internos y externos. Finalmente, se procedió a la sutura quirúrgica de la región ventral del cuello y a la espera de la recuperación del animal antes de ser llevado nuevamente al bioterio. El éxito de la GCSx se evaluó tanto durante el acto quirúrgico, mediante la confirmación al microscopio óptico de la arquitectura ganglionar y sus ramas, como posterior a la cirugía mediante la confirmación de la ptosis palpebral o blefaroptosis bilateral. Animales con ptosis unilateral o bilateral parcial no fueron incluidos en los estudios posteriores. Los animales del grupo control fueron sometidos a los mismos pasos quirúrgicos sin llegar a la remoción de los GCS. Ambos grupos fueron trasladados finalmente al bioterio y mantenidos en las mismas condiciones ambientales descriptas anteriormente hasta el sacrificio a las 3 semanas de la cirugía.

## Procesamiento y preparación de las muestras

Finalizada la fijación de los tejidos en PFA al 4%, los mismos se enjuagaron tres veces en PBS y se deshidrataron en alcoholes de concentraciones crecientes (50, 70, 80, 96 y 100%), durante 10 a 60 minutos en cada solución dependiendo del tamaño de los órganos procesados. En el caso de los cerebros enteros, fueron incubados toda la noche en alcohol absoluto, a 4°C, con el fin de lograr una deshidratación completa. Una vez completado el procedimiento de deshidratación, las muestras fueron tratadas dos veces con xileno por 10 o 30 minutos cada una y luego con una mezcla 1:1 de xileno-histoplast (Biopack), la cual se dejó solidificar a temperatura ambiente. Finalmente la mezcla fue reemplazada por histoplast puro lo cual requirió el uso de una estufa a 60°C. Se realizaron dos pasajes en la mezcla de polímeros plásticos antes de la inclusión final de los bloques tisulares y el armado de los tacos, los cuales fueron almacenados a 4°C hasta el momento de realizar los cortes. Las secciones de tejido de un espesor de 3 a 10 µm se realizaron utilizando un micrótopo Microm HM-325 en una sala refrigerada. Los cortes fueron expandidos utilizando un baño termostático a 40°C y luego se los secó por 20 minutos en estufa a 60°C. Los cortes se almacenaron en cajas cerradas a 4°C hasta su utilización.

## Técnica de Inmunohistoquímica

El procedimiento inmunohistoquímico aplicado en este trabajo fue previamente descrito por Semino-Mora y cols. y Savastano y cols. con algunas modificaciones [216, 217]. En su procesamiento, las secciones montadas fueron desprovistas del exceso de *histoplast* mediante baños de xileno y rehidratadas en soluciones de alcohol en concentraciones decrecientes hasta llegar a agua pura.

En el transcurso de esta Tesis fuimos realizando modificaciones al protocolo de IHQ con el fin de optimizar al máximo las condiciones para cada anticuerpo. En el proceso de exposición de epitopes con citrato en calor, realizamos modificaciones tanto del *buffer*, que fue utilizado en dos concentraciones 0.1 y 0.01 M de citrato a pH: 6, como en el calentamiento, con microondas a potencia media durante 15 minutos o en olla a presión con mechero Bunsen durante 30 minutos, seguido de 30 minutos de enfriamiento gradual.

El método que elegimos para realizar la recuperación antigénica es un paso crucial para detectar algunas moléculas. Por ejemplo, el de calentamiento en *buffer* citrato 0.01 M con olla a presión resultó más efectivo para detectar las fibras GAD67 positivas. Sin embargo, otros anticuerpos como el anti-GABA y el anti-NeuroD1 (6300) no se vieron favorecidos por este tratamiento. Luego de la exposición de epitopes, los cortes fueron lavados 3 veces en PBS durante 5 minutos cada vez. Para enmascarar los sitios de unión inespecífica, los cortes fueron incubados por 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente con solución de bloqueo, cuya composición también presenta dos variantes:

Solución de bloqueo 1: [Tris-HCl 50 mM pH 7.3, NaCl 0.125 M, suero normal de caballo al 5% (v/v), 20 mg/ml de albúmina sérica bovina fracción V (BSA, del inglés *bovine serum fraction*, Sigma) y 5 mg/ml de leche en polvo con bajo contenido en grasa]

Solución de bloqueo 2: [PBS 0.2 M pH 7.5, suero normal de burro (Jackson) al 10% (v/v), gelatina (Sigma) 4 mg/ml, tritón al 0.5%]

Las inmunomarcaciones fueron realizadas con los anticuerpos primarios incluidos en la Tabla 1, diluidos en solución de bloqueo 1 pero sin suero o en la solución de bloqueo 2 con suero al 2%. Las incubaciones se realizaron a 4°C o a temperatura ambiente toda la noche en cámara húmeda. Posteriormente los cortes fueron lavados en *buffer* (Tris-HCl 50 mM pH 7.3, NaCl 0.125 M y 0.05% de tween-20) o con PBS 0.1 M, e incubados por 2 hs a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios directamente marcados con un fluoróforo o anticuerpos biotinilados (Tabla 2). Los cortes destinados al método indirecto de inmunodetección (biotinilado) fueron incubados con una avidina conjugada con un fluoróforo o con la enzima peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*) y en las mismas condiciones que los anticuerpos secundarios. La detección de la HRP fue colorimétrica mediante el uso del sustrato 3,3'-diaminobencidina (DAB) y después de la misma se procedió a una contratinción con el colorante catiónico hematoxilina con avidez por ácidos nucleicos. En los ensayos dobles y triples, las inmunomarcaciones se realizaron sucesivamente o mezclando los anticuerpos primarios en una sola incubación. Se utilizó medio de montaje conteniendo ioduro de propidio (IP) diluido en la mezcla propil galato-PBS-Glicerol, o con el reactivo ProLong® Gold con 4',6-diamidino-2-phenilindol (DAPI). IP y DAPI son marcadores fluorescentes nucleares universales, y tienen una longitud de excitación/emisión de 493/636 nm y 358/461 nm respectivamente. Los controles negativos

incluidos en los ensayos inmunohistoquímicos fueron sometidos al mismo procedimiento pero en ausencia de él o los anticuerpos primarios. Los controles positivos y la puesta a punto de los anticuerpos se realizaron en cortes de cerebelo. Las secciones fueron examinadas, en un microscopio confocal *Olympus FluoView™ FV-1000* y/o en un microscopio *Nikon 80I*, según correspondió. Las imágenes fueron procesadas con *MacBiophotonic Image J* y editadas con *Adobe Photoshop 7.0*.

**Tabla 1: Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de IHQ.**

<i>Anticuerpo</i>	<i>Especie de origen</i>	<i>Dilución</i>	<i>Proveedor</i>
<i>DCK6300</i>	Conejo	1:50	Dr. Klein-NIH-USA
<i>Anti-GAD67</i>	Ratón	1:200	Abcam
<i>Anti-GABA</i>	Conejo	1:200	Millipore
<i>Anti-RGABA<sub>A</sub>α1</i>	Conejo	1:200	Millipore
<i>Anti-RGABA<sub>B</sub>1</i>	Ratón	1:200	Abcam
<i>Anti-Pax6</i>	Ratón	1:200	Abcam
<i>Anti-Iba1</i>	Cabra	1:200	Abcam
<i>Anti-Tuj1</i>	Ratón	1:500	Covance
<i>Anti-Actina</i>	Conejo	1:100	Sigma
<i>Anti-VIM</i>	Ratón	1:100	Sigma
<i>Anti-TH</i>	Ratón	1:200	Donado por Seltzer AM
<i>Anti-mGluR5</i>	Conejo	1:200	Epitomics
<i>Anti-VGLUT1</i>	Ratón	1:200	Abcam
<i>Otros</i>			
<i>Isolectina IB4- Alexa Fluor 488</i>	<i>Griffonia simplicifolia</i>	1:200	Life Tech.

**Tabla 2: Anticuerpos secundarios y avidinas marcadas utilizados en los ensayos de IHQ.**

<i>Anticuerpo</i>	<i>Especie de origen</i>	<i>Dilución</i>	<i>Proveedor</i>
-------------------	--------------------------	-----------------	------------------

<b><i>Método Directo</i></b>			
<b><i>Anti-conejo Alexa Fluor® 448</i></b>	Burro	1:300	Jackson
<b><i>Anti-ratón Cianina 3</i></b>	Burro	1:300	Jackson
<b><i>Método Indirecto</i></b>			
<b><i>Anti-conejo biotinilado</i></b>	Cabra	1:300	Vector
<b><i>Anti-ratón biotinilado</i></b>	Caballo	1:300	Vector
<b><i>Avidinas</i></b>			
<b><i>Estreptavidina-Fluoresceína</i></b>	-	1:300	Vector
<b><i>Estreptavidina-Texas Red</i></b>	-	1:300	Vector
<b><i>Estreptavidina-HRP</i></b>	-	1:300	Vector

## Cuantificación de las células GABAérgicas de la glándula

Las células GABAérgicas fueron identificadas mediante IHQ para la enzima GAD67 y su producto GABA. La marcación de estas células fue débil y bastante difícil de detectar por lo que las cuantificaciones se realizaron con fotos a alto aumento tomadas con el objetivo de 60X con zoom de 2X. Se tomaron imágenes de un total de 10 glándulas y se clasificaron y cuantificaron todas las células por campo. El número total de células cuantificadas se clasificó en diferentes grupos según la morfología nuclear (pinealocitos o intersticiales) y en función de la presencia de marcadores GABAérgicos (GABAérgicas y no GABAérgicas). Se analizaron GP de diferentes ZT, al no detectarse una diferencia significativa entre ellas se la incluyó a todas en la misma cuantificación. La cuantificación de estas células se realizó con ayuda de la herramienta *Cell Counter* del programa *ImageJ*. Los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa estadístico *PRISM 5* (*GraphPad Software Inc.*).

## Técnica de western blot

Las GP de rata adulta recolectas a diferentes ZT (ZT6, 14, 18) fueron almacenadas en tubos eppendorf en grupos de al menos 10 glándulas debido a su pequeño tamaño. El contenido de cada tubo se homogenizó y procesó para obtener extractos con volumen y

concentración de proteínas apropiadas. Se utilizaron cerebelo, hipocampo y páncreas como controles. Los homogenatos fueron separados en fracciones citoplasmáticas y nucleares utilizando el kit comercial *CellLytic™ NuCLEAR™ Extraction* (Sigma) y siguiendo las instrucciones del proveedor. Los *buffers* de lisis utilizados fueron suplementados con un cóctel 1X de inhibidores de proteasas provisto por el kit [Solución madre: 100X; composición: 4-(2-aminoetil) benzenosulfonilo fluoruro (AEBSF), pepstatina A, bestatina, leupeptina, aprotinina y trans-epoxysuxinilo-leucilo-amida (4-guanidino)-butano (E-64)], y con el agente reductor ditioneitol (DTT) y el inhibidor de fosfatasa fluoruro de sodio (NaF) a concentraciones finales de 1 y 10 mM, respectivamente. La concentración proteica total de los extractos obtenidos fue determinada por la técnica de Bradford (Sigma) y mediante el uso de BSA como proteína estándar. Se sembraron aproximadamente 60 µg de proteína por carril para la detección de GAD67. Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% mediante electroforesis en *buffer* de corrida 1X (Tris 0.025 M pH 8.3, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%) durante 80 minutos a 120 V. Luego las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), utilizando un *buffer* de transferencia 1X (Tris 0.025 M pH 8.3, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%, metanol al 20%) durante 180 minutos a 30 V. Finalizada la transferencia, la membrana fue teñida con *Ponceau* 4R para verificar la eficiencia de la misma mediante la visualización de las bandas proteicas y seguidamente se bloquearon los sitios de unión inespecífica mediante el uso de una solución de bloqueo [10% (p/v) de leche descremada en *buffer* de lavado: PBS con tween-20 al 0.05%] por 1 h a temperatura ambiente. Como control adicional de la transferencia, el gel remanente fue sometido a una tinción con *Coomassie* R-250 con el fin de confirmar la ausencia de proteínas. Luego del bloqueo, la membrana fue enjuagada 3 veces por 10 minutos en agitación con la solución de lavado y posteriormente se la incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario diluido en solución de lavado. El exceso de anticuerpo primario fue eliminado con tres lavados en *buffer* durante 10 minutos cada uno y en agitación permanente. La membrana fue incubada consecutivamente con el anticuerpo secundario biotinilado y la avidina-HRP en solución de lavado a temperatura ambiente por 1 h en cada caso y con tres lavados intermedios. El anticuerpo utilizado para la GAD67 es el mismo que para la IHQ (Tabla1) en una concentración de 1:2000. Finalmente, la membrana fue revelada por quimioluminiscencia utilizando una mezcla 1:1 de las soluciones 1 (Tris-HCl 20 mM pH: 8.5; luminol 2.5 mM, Sigma; ácido cumárico 0.4 mM, Sigma) y 2 (Tris-HCl 10 mM pH: 8.5; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.02%). Las bandas proteicas detectadas fueron visualizadas con un equipo LAS-1000 (*Fujifilm*).



## Hibridación *in situ*

Para los ensayos de HIS se utilizaron tejidos fijados con PFA 4% mediante perfusión y posterior incubación por inmersión durante 24 horas. Luego los tejidos fueron lavados con PBS para eliminar el exceso de fijador y sometido a un gradiente de sacarosa del 30 al 15% como proceso crio-preservador. El congelamiento del tejido se realizó rápidamente mediante isopentano previamente enfriado a -80°C y se conservaron a esta temperatura hasta el momento de su procesamiento. Los cortes de un espesor de entre 15 y 20 micras se realizaron mediante un crióstato y fueron montados en portaobjetos cargados positivamente. Los ensayos fueron realizados con cortes frescos de no más de una semana de almacenamiento a 4°C.

La técnica de HIS se puede dividir en tres secciones:

1) Pre-tratamiento del corte: los cortes almacenados a 4 °C se pusieron en estufa de secado por 20 minutos a 55-60°C. Luego de un lavado con PBS se realizó una post-fijación con PFA al 4% por 10 minutos. El corte fue lavado con PBS y se lo incubó con proteinasa K (Sigma) por 3 minutos. Se realizó una nueva fijación con PFA al 4%, se lavó con PBS y se incubó en una solución compuesta por trietanolamina (TEA, Sigma), ácido clorhídrico (HCl) y ácido acético anhidro (Sigma), por 10 minutos. Posteriormente, se permeabilizaron los tejidos con Tritón/PBS al 1% por 30 minutos y se lavó con PBS.

2) Hibridación: se procedió a la incubación de la muestra en cámara húmeda con la solución de prehibridación [0% formamida (Calbiochem), 5X SSC, libre de ARNasa, 5X solución de *Denhardt's* (Sigma), 250 µg/ml y ARNt de levadura) a temperatura ambiente por 2 horas. Finalmente se incubó con la sonda marcada con digoxigenina (DIG) diluida en solución de prehibridación a 70°C por 14 hs.

3) Detección por IHQ: Se retiró la solución de hibridación y se enjuagó con una solución de lavado (SSC al 1% y formamida al 50%) a 70°C por 45 minutos. Se realizaron tres lavados por 10 minutos el *buffer* B1-T (Tris-HCl 0.1 M pH: 7.5, NaCl 0.15 M y tween-20 al 0.1%). Luego se procedió a la incubación con solución de bloqueo

(suero de cabra al 10% en B1) por 1 h y posteriormente con el anticuerpo contra la DIG conjugado con fosfatasa alcalina (Roche) diluido 1:2500 en solución de bloqueo por toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó el anticuerpo con B1-T, se ajustó el pH con B3 (Tris-HCl 0.1 M pH: 9.5, NaCl 0.1 M, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, tween-20 al 0.1% y levamisol, Sigma) por 5 minutos y se incubó con B4 (B3 más NBT/BCIP) hasta que observamos la aparición del precipitado azul producido por el clivaje de BCIP en presencia de NBT (1 a 24 hs). Una vez obtenida la marca se detuvo la reacción con lavados con PBS. Los preparados se montaron una mezcla de glicerol/PBS 1:1 y las imágenes se obtuvieron por microscopía óptica convencional.

**Tabla 3: Sondas utilizadas en la técnica de HIS.**

Nombre y tamaño	Cebadores	Secuencia de referencia
Gad1 (982 pb)	Directo: TGTGCCCAAACCTGGTCCT Inverso: TGGCCGATGATTCTGGTT	NM_008077
Viaat (772 pb)	Sonda donada por G. Lanuza (FIL, Bs. As.)	NM_009508.2
NeuroD1	Sonda donada por G. Lanuza (FIL, Bs. As.)	NM_010894.2

### Técnica de transcripción inversa seguido de reacción en cadena de la polimerasa

Las muestras destinadas a esta técnica fueron extraídas de la misma forma que las anteriores, pero fueron almacenadas directamente a -80°C en tubos estériles individuales vacíos o con trizol (Sigma) para mantener la integridad del ARN. El ARN total de un homogenato de 3 glándulas fue extraído mediante homogenización (ULTRA-TURRAX®-IKA) en trizol a 4°C. Luego se adicionó cloroformo (Sigma), se agitó mediante *vortex* y se dejó reposar. Posteriormente, se realizó una centrifugación para separar la mezcla/solución en una fase acuosa y una orgánica. El ARN fue extraído de la fase acuosa donde se lo precipitó mediante alcohol isopropílico (Sigma) y se lo volvió a centrifugar hasta obtener un *pellet* que luego fue resuspendido en agua. La medición de la concentración de ARN se realizó mediante el *kit Qubit® RNA Assay* (Invitrogen) utilizando el fluorómetro Qubit

(Invitrogen). El ARN extraído se incubó con desoxirribonucleasa 1 (DNAasa1) más su *buffer* por 15 minutos a temperatura ambiente, luego se adicionó la solución de frenado de la reacción (50 mM EDTA) y se calentó por 10 minutos a 70°C para desnaturalizar la enzima. Se utilizó la técnica en dos pasos que consiste en:

1) Obtención de ADNc: se preparó una solución de reacción que consiste en el ARN extraído (0.5 µg), los cebadores al azar y la mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTP, Invitrogen) y se los calentó por 5 minutos a 65°C. Luego se la dejó reposar en hielo y se le agregó el *buffer* 5X de la enzima, DTT 0.1M y la transcriptasa reversa (Invitrogen) y se colocó el tubo en el termociclador (ESCO) (10 minutos a 25°C, 60 minutos a 58°C y 5 minutos a 85°C).

2) PCR: se preparó un tubo con mezcla madre (*buffer* de la enzima 10X, agua DEPC, mezcla de dNTP 10 mM, MgCl 50 mM y la Taq ADN polimerasa Brasil, Life Tech.). En cada tubo de PCR se adicionó la mezcla madre, el ADNc obtenido en el paso anterior y los cebadores específicos que figuran en la Tabla 4. Se colocaron los tubos en el termociclador y se corrió el programa de amplificación (desnaturalización, alineamiento y elongación) óptimo para cada cebador lo cual se estableció por puesta a punto previa. El producto de la PCR (mezclado con *buffer* de carga 10X, Quality Biological), se analizó por la siembra directa en un gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE con GelRed (Biotium) para la marcación de los ácidos nucleicos. La corrida electroforética se realizó a 70 V por 1.30 hs en *buffer* TAE 1X. Posteriormente el gel se analizó y fotografió en un equipo LAS-1000. Para definir los pesos moleculares se corrieron las muestras en paralelo con un marcador de peso molecular (Axygen) con bandas de 100 a 1000 pb.

**Tabla 4: Cebadores utilizados en la técnica de RT-PCR**

<i>Nomenclatura</i>	<i>cebador directo</i>	<i>cebador inverso</i>	<i>Producto(pb)</i>	<i>secuencia de referencia</i>
<b>GADI</b>	5' CGCAGGCACGACTGTTTATG 3'	5'TGACCAGGATGGCAGAACAC 3'	224	NM_017007.1
<b>AANAT</b>	5' CTTTGGGACAAGGAGAGACTTAC 3'	5'CCCTTACCTCTCTACTCCACTT 3'	482	NM_012818.2
<b>TPHI</b>	5' CAGTGGCTTTGAGGTCTCTT 3'	5' TCTCGGTTGATGTCGCAGTC 3'	280	NM_001100634.2
<b>ACTINA</b>	5' CTTCTTCCTGGGTATGGAATC 3'	5' TCAGTAACAGTCCGCCTAGA 3'	353	NM_031144.3
<b>HIOMT</b>	5' TGAGGCTAGGATAGGCAAGA 3'	5' CGATGACATCAGGGAGATCAAA 3'	662	NM_144759.2
<b>RGABA<sub>B1</sub></b>	5' AGATCGGCTACTACGACAGC 3'	5' AGAAAATGCCAAGCCACGTA 3'	675	NM_031028.3
<b>RGABA<sub>A1</sub></b>	5' TCCATGATGGCTCAAACCGTG 3'	5'CATCCAGCAGTCGGTCCAAA 3'	327	NM_183326.2

## Administración de noradrenalina, bicuculina y muscimol en los ensayos *in vivo*

Los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo mediante inyecciones intraperitoneales (i.p.) de las drogas. El esquema de trabajo y los argumentos para su diseño se exponen en el Capítulo IV de Resultados. Las dosis administradas fueron de 1 mg/Kg en un volumen de 200 µl, tanto para la NA como para la bicuculina (BIC) y el muscimol (MUS). En las experiencias con doble droga, estas fueron inoculadas simultáneamente en una mezcla con un volumen final de 200 µl. La solución madre de NA se disolvió en HCl 0.5 N, la de MUS en HCl 0.05 N y la de BIC en agua mQ según las recomendaciones de los fabricantes. En cada experiencia se realizaron los ensayos por triplicado (N=3) y los controles fueron inyectados con el mismo volumen de solución fisiológica. Las inyecciones fueron aplicadas a ZT6 y los animales fueron sacrificados a ZT9 y 10. Para la extracción de las muestras destinadas a los ensayos farmacológicos, los animales fueron sacrificados por decapitación previo adormecimiento con CO<sub>2</sub>, sin el uso de anestésicos. Esta medida se tomó en base a la posible interferencia que las drogas anestésicas pudieran generar en los resultados. Las GP fueron recolectadas rápidamente en hielo y protegidas de la luz. Se las almacenó en tubos individuales a -80°C hasta su procesamiento por HPLC.

## Cultivo organotípico a largo plazo de GP adulta

Se trabajó con el medio de cultivo BGJb (Gibco/Invitrogen) adicionado con 250 mg de BSA y 6.25 ml de *buffer* Hepes (1 M, pH: 7.3) cada 250 ml de medio. Antes de su utilización se adicionó, cada 10 ml de medio completo, 100 µl de una solución

antibiótica/antimicótica (penicilina/estreptomicina/fungizona, Sigma) y 100 µl de una solución de glutamina y ácido ascórbico (AA) (20 ml glutamina 200 mM/ 200 mg AA).

#### Preparación de los cultivos de pineal de rata:

Previo a la obtención de las GP se prepararon placas de 24 pocillos con 200 µl de medio de cultivo completo y se incubaron en estufa (5% CO<sub>2</sub>/ 95% oxígeno) a 37°C por 30 minutos.

Los animales fueron sacrificados y las GP se colectaron en 10 ml de medio DMEN (Sigma) adicionado con antibióticos/antimicóticos/glutamina/AA. Se removió el tejido excedente de cada GP teniendo la precaución de trabajar en frío, con rapidez y sin dañar la capsula de la pineal. Concluido este paso, se colocaron dos GP por pocillo y se incubaron por 24 hs. Al día siguiente se realizaron dos cambios de medio, uno por la mañana y otro por la tarde. Al tercer día se efectuó el último cambio de medio y se llevaron a cabo los ensayos farmacológicos. Se utilizó NA 1 µM para inducir la síntesis de melatonina y 10 µM de BIC y MUS para evaluar el efecto del bloqueo y activación de los RGABA<sub>A</sub> respectivamente. Se trabajó con 28 glándulas divididas en 7 grupos (Control: Sol fisiológica; NA; NA-BIC; NA-MUS; BIC; MUS y BIC-MUS). Las drogas se añadieron directamente en el medio en el que se encontraban las GP; y en los ensayos con drogas GABAérgicas, estas se administraron 10 minutos antes que la NA. Se permitió actuar a las drogas por 3 hs y luego las GP fueron colectadas del medio y congeladas inmediatamente en el freezer de -80°C en tubos individuales. De esta manera quedaron almacenadas hasta su posterior procesamiento para HPLC.

#### Cromatografía líquida de alta eficiencia

El protocolo utilizado es el de Wagner y cols. con algunas modificaciones [218]. Las GP destinadas a la medición de serotonina fueron homogeneizadas en ácido perclórico 0.2 N (400 µl por GP) en los mismos tubos de recolección utilizando un homogenizador (ULTRA-TURRAX®-IKA) y la muestra se mantuvo fría durante todo el procesamiento mediante baños de hielo. Posteriormente el homogenato fue centrifugado a 3500 rpm por 20 minutos a 4°C y se rescató el sobrenadante, el cual fue almacenado a -80°C hasta la medición de la serotonina en el HPLC. Después de su procesamiento, alícuotas de las

muestra fueron inyectadas en el sistema de HPLC, el cual consiste en una bomba ISCO 2350, una válvula inyectora Valco (modelo C6W), una columna de fase reversa Spherisorb ODS 2 (partículas de 5  $\mu$ m, 250 X 4.6 mm i.d.) y un detector electroquímico L-ECD-6A (modelo Shimadzu) con electrodos de carbón vitrificado, el cual pudo detectar claramente la presencia de serotonina en las muestras. Las concentraciones de las muestras se calcularon mediante la relación del área de la curva de serotonina con respecto a la del estándar interno de concentración conocida, y la expresamos en función del volumen inyectado y extrapolado al contenido total extraído por GP. Los resultados se presentan en ng de serotonina por glándula.

## Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los experimentos fueron expresados como la media  $\pm$  SEM y fueron analizados usando el programa PRISM 5 (*GraphPad Software Inc.*). Se realizó un ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey;  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

# **RESULTADOS**

## **Capítulo I**

## Análisis del sistema GABAérgico en la ontogenia de la glándula pineal de rata

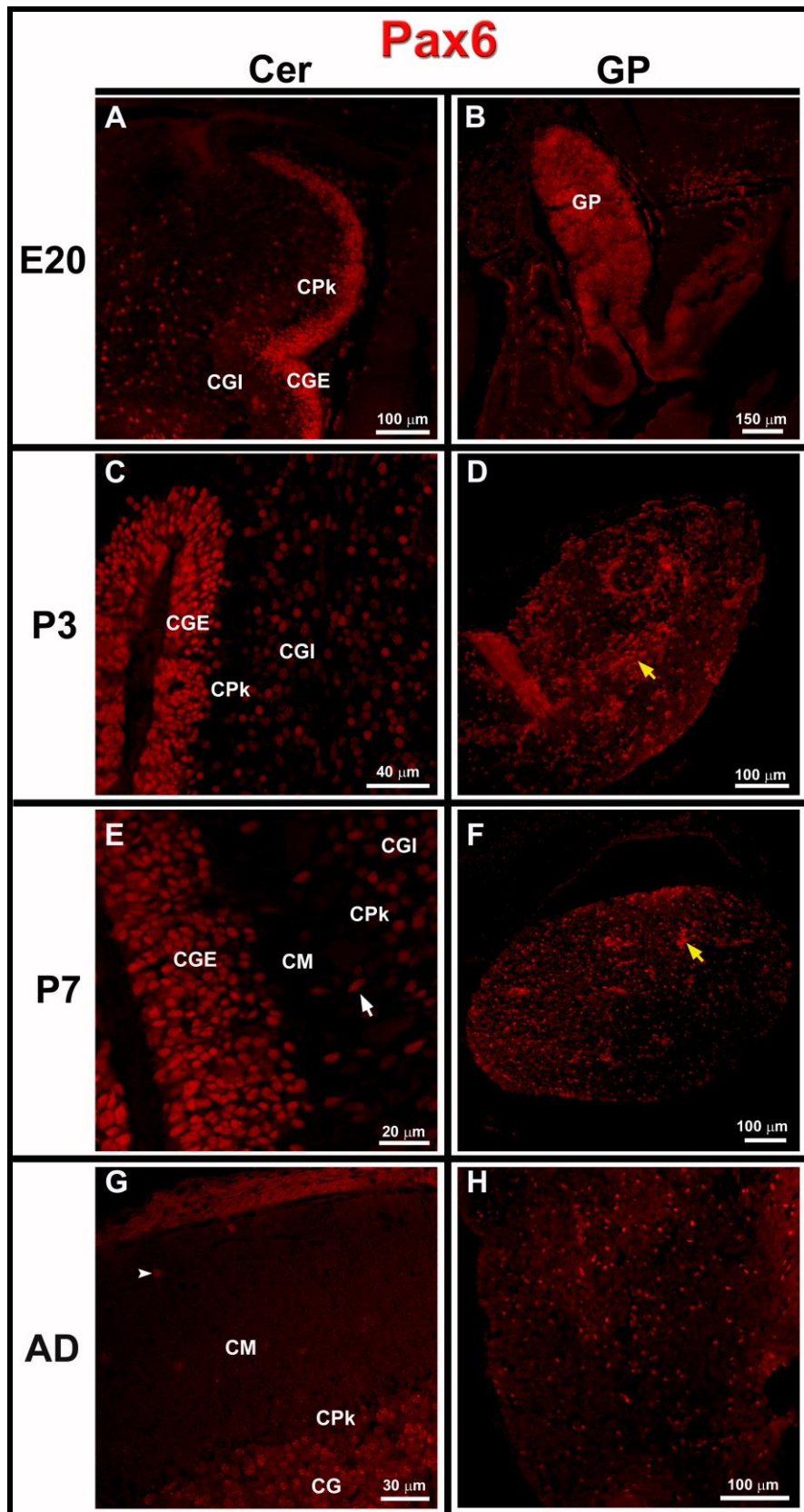
Se sabe que el sistema GABAérgico juega un rol importante en el desarrollo del cerebro en general, aunque existe poca información en cuanto a su existencia, localización y funcionalidad en la ontogenia de la GP. En el presente Capítulo nos propusimos localizar los componentes de este sistema desde estadios embrionarios tempranos (E15) hasta posnatales (P7), periodo en el cual la GP se forma y se desarrolla, dejando el análisis de la GP adulta para la siguiente sección. Se presentan también los resultados obtenidos en cerebelo ya que se trabajó en paralelo con este órgano como un sistema de referencia. En el caso del cerebelo se aborda todo el desarrollo desde la vida embrionaria, posnatal y adulta. Además, nos fue de gran utilidad la detección del factor de transcripción Pax6 como referencia dentro del tejido embrionario. Mediante anticuerpos específicos del sistema GABAérgico buscamos determinar las posibles fuentes de GABA y los sitios donde éste podría impactar en sus receptores tanto ionotrópicos como metabotrópicos.

### Pax6 como marcador del desarrollo

El factor de transcripción Pax6 es fundamental en la formación de la glándula pineal y es expresado en altos niveles por las células precursoras, las que al diferenciarse van reemplazándolo por Pax4, otro factor de transcripción de la misma familia [161]. Pax6 se expresa en casi todas las células del primordio pineal, a partir de E15 y durante todos los puntos del desarrollo embrionario que analizamos, mostrando un aumento en heterogeneidad a medida que avanzamos en el desarrollo (FIG. 6 B). Esta característica lo hace un buen marcador del grado de diferenciación celular, ya que los niveles van disminuyendo gradualmente dando como resultado una marcación heterogénea en el órgano bajo estudio. Este aspecto es más evidente en tejidos estratificados como el cerebelo, donde las células de la CGE (menos diferenciadas) presentan niveles más elevados de Pax6 que las de la CGI (más diferenciadas) (FIG. 6 A, C y E). En las células granulares del cerebelo adulto se mantienen niveles muy bajos de Pax6 y algunas células positivas aún se pueden detectar en la CM (FIG. 6 G). Por otro lado, en la GP adulta son claramente detectables un considerable número de células con un elevado nivel del factor



de transcripción en sus núcleos (FIG. 6 H). En el Capítulo II se retomará esta discusión en base a la relación Pax6-RGABA<sub>B</sub>1.

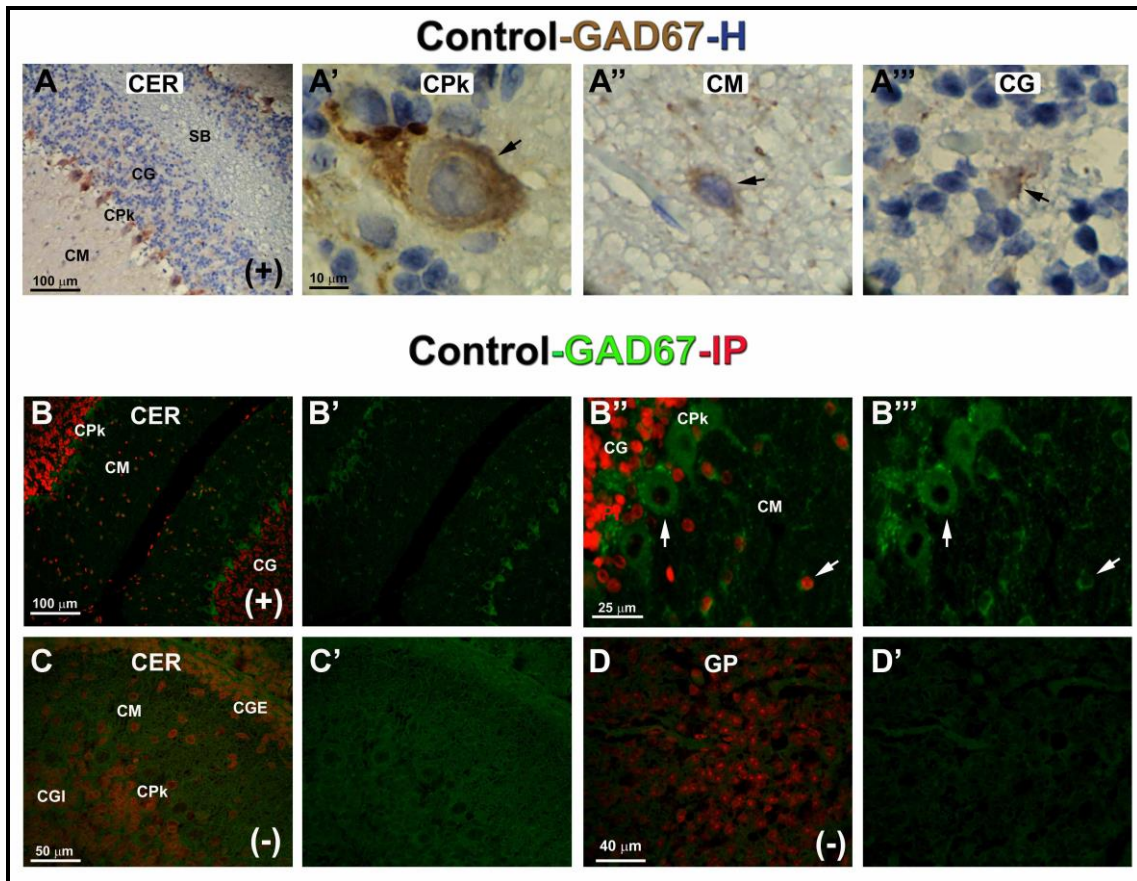


**FIG. 6: Pax6 como marcador del grado de desarrollo.**

A-H) IHQ para Pax6 (rojo) en distintos estadios del desarrollo del cerebelo (A, C, E y G) y la GP (B, D, F y H). A) En cerebelo E20 la mayor concentración de células Pax6<sup>+</sup> se localiza en la CGE y algunas células han comenzado a colonizar la futura CGI. B) En la GP E20 casi todas las células del primordio contienen Pax6, aunque comienza a visualizarse la heterogeneidad en su expresión. C) En el cerebelo P3 se puede apreciar una CGE gruesa de células con alta expresión de Pax6, una CPk sin expresión y la CGI formándose con células con niveles variables del factor. D) En la GP P3 un gran número de células mantiene la expresión de Pax6 y se organizan en cúmulos (flecha amarilla). E) En el cerebelo P7 las capas embrionarias aún son claramente visibles y se puede observar la región de la futura CM a lo largo de la cual se distinguen los núcleos Pax6<sup>+</sup> ahusados de las células migrando entre la CGE y la CGI (flecha blanca). F) En la GP P7 los agrupamientos Pax6<sup>+</sup> son más pequeños (flecha amarilla) y las células positivas están más dispersas. G) En el cerebelo adulto los niveles del factor de transcripción son muy bajos en las células granulares y quedan algunas alojadas en la CM (cabeza de flecha). Note que la CGE ya no existe. H) En la GP adulta aún se puede detectar un número considerable de células Pax6<sup>+</sup> que se distribuyen al azar. AD: adulto. Microscopía confocal A) 20X. B) 10X. C) 60X, más zoom 1.6X. D) 10X, más zoom de 1.5X. E) 60X, más zoom de 1.5X. F) 10X, más zoom de 1.5X. G) 60X. H) 20X, más zoom de 1X.

## Especificidad del anticuerpo contra GAD67

Mediante IHQ utilizando un anticuerpo específico para GAD67, buscamos explorar las posibles fuentes de GABA en el desarrollo embrionario de la GP. Se utilizaron cortes de cerebelo como control positivo del anticuerpo, en los cuales demostró ser muy preciso en la localización de las poblaciones GABAérgicas. El revelado se realizó con dos técnicas distintas, por la detección de la HRP mediante DAB y por fluorescencia (FIG. 7). Las células más prominentemente marcadas resultaron ser las de Purkinje (CPk), aunque también marca células en la capa molecular (CM), posiblemente células estelares, y en la capa granular (CG) a posibles Golgi II (FIG. 7 A-B'''). En los controles negativos donde se omitió el anticuerpo primario, no se distinguen las poblaciones GABAérgicas del cerebelo ni en la GP adulta (FIG. 7 C-D').



**FIG. 7: Control de especificidad del anticuerpo anti-GAD67.**

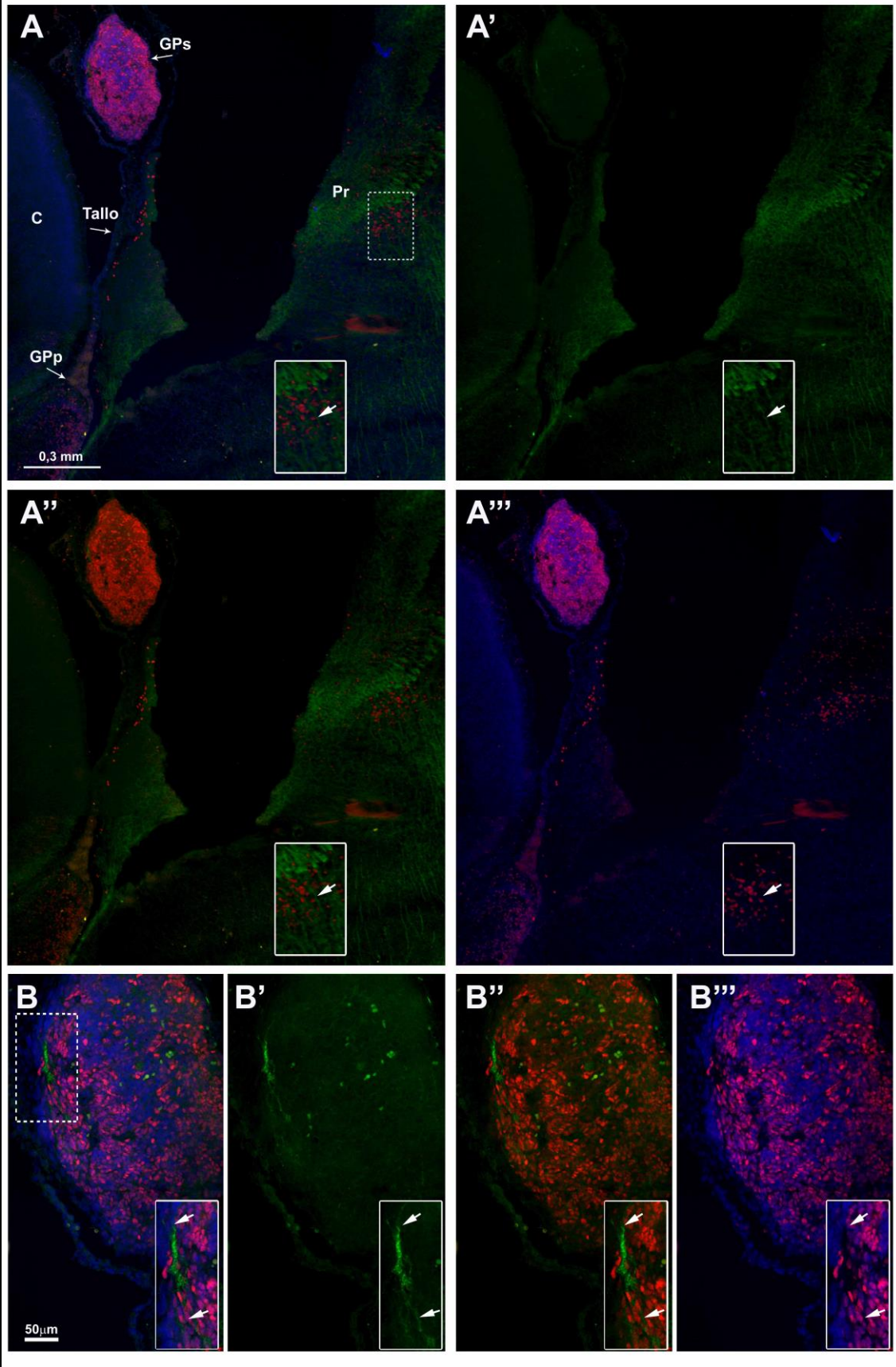
A-A''') IHQ para GAD67 en cerebelo de rata adulta revelada con HRP-DAB. El precipitado marrón destaca los citoplasmas de las diferentes poblaciones GABAérgicas del cerebelo; siendo la monocapa de células de Pk la más fuertemente marcada. La contratinción con hematoxilina permite la visualización de los núcleos celulares. A'-A''') Ampliaciones de cada tipo celular; las flechas negras indican las células GABAérgicas. A') Célula de Pk; A'') Posible célula estelar en la CM y A''') posible célula de Golgi II en la CG. B-B''') GAD67 en cerebelo postnatal (P17) por inmunofluorescencia (verde). Se destaca nuevamente la CPk. B''-B''') A mayor aumento se puede visualizar un patrón fluorescente puntiforme en el citoplasma y las prolongaciones de las células de Pk, así como las células GABAérgicas de la CM (flechas blancas). C-D') Controles negativos sin el anticuerpo primario; C-C') Cerebelo P15; D-D') Glándula pineal adulta. CER: Cerebelo. CG: Capa granular. CGE: Capa granular externa. CGI: Capa granular interna. CM: Capa molecular. CPk: Capa de células de Purkinje. GP: Glándula pineal. H: Hematoxilina. IP: Ioduro de propidio. Microscopía convencional y confocal. A) 20X. A'-A''') 100X, más zoom de 1.5X. B-B') 20X. B''-B''') 40X, más zoom de 4X. C-C') 40X. D-D') 60X.

## Fuentes de GABA en el desarrollo embrionario de la glándula pineal de rata

Para localizar células GABAérgicas en el periodo embrionario se utilizaron anticuerpos específicos contra la enzima biosintética GAD67 y contra el neurotransmisor GABA. Con ninguno de los marcadores se logró detectar células GABAérgicas en el cuerpo de la GP en los estadios embrionarios analizados. Sin embargo, en embriones en estadio E21, observamos señal para GAD67 en el tallo y en una región de la GP superficial (GPs), aunque no parece localizarse en células, por lo que suponemos que podrían ser fibras de la inervación central en formación (FIG. 8). Además, se pueden observar grupos de neuronas GABAérgicas en regiones adyacentes a la GP en el tejido nervioso (FIG. 8 A-A’’’). La marca en estas células podemos considerarla como un control positivo de la técnica, que pone en evidencia la negatividad en GP. También se encontraron fibras GABAérgicas en regiones más profundas del cerebro, similares a las que se localizaron en la GPs. Una observación importante es que el anticuerpo contra GAD67 aunque localizó fibras y células en distintas regiones del cerebro, no pudo detectar a células GABAérgicas en el cerebelo embrionario. Esto podría deberse a que en el desarrollo embrionario del cerebelo no se expresa la isoforma GAD67. Las GADs presentan una expresión diferencial dependiendo de la región y del estadio del desarrollo que se analice [219, 220].

En la FIG. 8 se muestra la doble marcación Pax6/GAD67 lo cual fue útil por dos motivos, por un lado Pax6 es un buen marcador del nivel de desarrollo de la GP y por otro es un factor de transcripción involucrado en la diferenciación del fenotipo glutamatérgico [161, 187, 188]. De esta manera mediante su detección pudimos apreciar que los grupos de células GABAérgicas en el cerebro no se ubican en dominios de alta expresión de Pax6. Este rasgo queda en evidencia en la región del pretectum donde podemos observar que las células GABAérgicas no contienen Pax6 en sus núcleos (FIG. 8 A-A’’’, *inset*). Esto puede explicar también la ausencia de células GABAérgicas en la GP en formación, la cual expresa este factor de transcripción en casi todas sus células durante el desarrollo embrionario. Estos datos resultan valiosos y serán abordados más adelante en el Capítulo III.

E21-GAD67-Pax6-DAPI

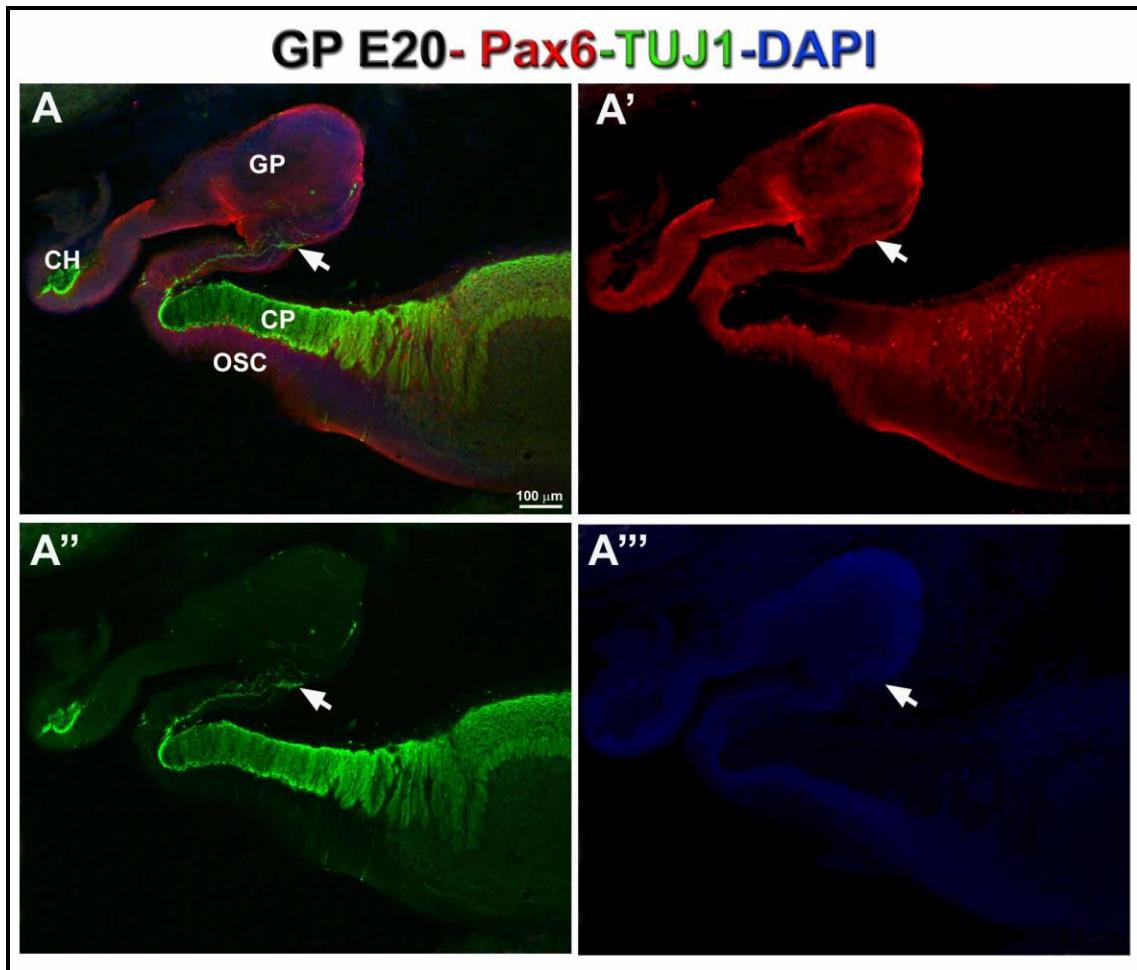


**FIG. 8: Fibras GABAérgicas en la glándula pineal embrionaria.**

A-A''') Doble IHQ para GAD67 (verde) y Pax6 (rojo) en cerebro E21; reconstrucción digital a partir de imágenes tomadas a 10X. Núcleos marcados con DAPI (azul). En la imagen se señalan las diferentes partes de la GP, la profunda (GPp), el tallo y la superficial (GPs). En todas las regiones de la GP podemos detectar la expresión de Pax6. Se pueden observar claramente células GABAérgicas en la región del pretectum (Pr). La región del recuadro punteado se muestra ampliada en la parte inferior de la imagen, donde puede apreciarse la relación entre las células GABAérgicas y Pax6, así como fibras similares a las observadas en la GPs (flecha blanca). B-B''') GPs, la región del recuadro punteado se muestra ampliada en la parte inferior de la imagen y se puede apreciar la presencia de fibras GABAérgicas (flechas blancas). Note en el *inset* de B''' la región sin núcleos correspondiente a la zona donde corre la inervación GABAérgica. No se observa señal de GAD67 correspondiente a células en la GP E21. C: Corteza cerebral. Microscopía confocal. A-A''') 10X; *inset*: zoom de 2X. B-B''') 40X; *inset*: zoom de 2X.

## Inervación de la glándula pineal en estadio E20

Para poner en evidencia las fibras nerviosas que penetran en el cuerpo del primordio pineal se recurrió a la detección de la tubulina III beta (Tuj1), un marcador universal de proyecciones nerviosas. A diferencia del marcador GAD67, con Tuj1 es posible seguir claramente todo el recorrido de las fibras nerviosas mientras penetran en el órgano (FIG. 9). Además mediante la doble tinción con Pax6 podemos demarcar claramente los límites entre el órgano subcomisural (OSC) que al igual que la GP expresa el factor de transcripción y la comisura posterior (CP) enriquecida en Tuj1. Estos datos anatómicos resultan importante más adelante cuando analizamos la localización de los receptores GABA metabotrópicos.



**FIG. 9: Inervación de la GP en E20.**

A-A'') Doble IHQ para Pax6 (rojo) y Tuj1 (verde) en GP de embrión E20. Núcleos marcados con DAPI (azul). Se puede apreciar que las comisuras habenulares (CH) y la posterior (CP) tienen una fuerte expresión de Tuj1. Además se ponen en evidencia las fibras nerviosas que penetran en la GP (flecha blanca) proveniente de la CP. Pax6 marca todo el primordio glandular y el OSC en desarrollo. Microscopía confocal. A-A''') 10X.

## Receptores GABA en el desarrollo de pineal y cerebelo

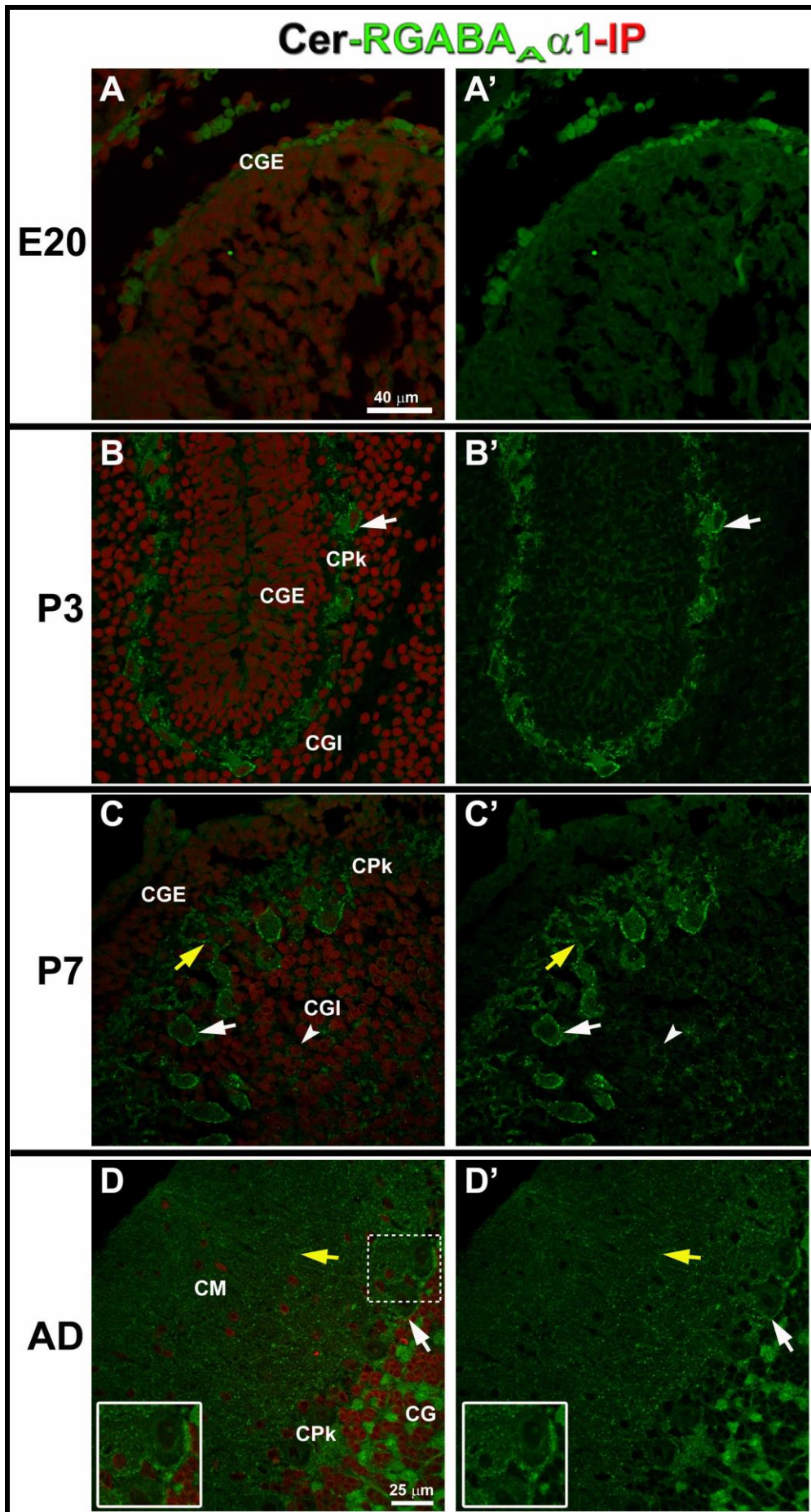
En cuanto a la recepción del GABA, analizamos la distribución y abundancia de la subunidad  $\alpha 1$  del receptor  $GABA_A$  (RGABA $_A\alpha 1$ ) ionotrópico y la subunidad B1 del receptor de GABA metabotrópico (RGABA $_B1$ ) en estadios embrionarios y neonatales.

## Localización del RGABA<sub>A</sub>α1 en el cerebelo en desarrollo

Se utilizó el cerebelo para comprobar la especificidad del anticuerpo anti-RGABA<sub>A</sub>α1, ya que existe una amplia bibliografía que atribuye al GABA una función activa durante su desarrollo. El análisis inmunohistoquímico de los receptores GABA se realizó en cortes de cerebros completos, por lo que en el mismo corte pudimos analizar la GP y el cerebelo, realizando un paralelismo entre ambos órganos.

Específicamente no pudimos detectar al RGABA<sub>A</sub>α1 en cerebelo durante el periodo embrionario; en la FIG. 10 A-A' se muestra un estadio embrionario avanzado (E20) donde no se observa señal específica. A nivel posnatal, pudimos observar una clara marca en la región de las futuras células de Purkinje (CPk). En P3, la señal se localiza principalmente en las células de Pk en diferenciación, las cuales aún no poseen su orientación ni arborización característica (FIG. 10 B-B'). En un estadio más avanzado (P7) podemos ver que las células de Pk mantienen la expresión del receptor y comienzan a desarrollar los árboles dendríticos. El receptor se localiza en el soma y las dendritas de estas células (FIG. 10 C-C'). En P7 aparecen también algunas células en la CGI con expresión del receptor. La expresión se mantiene hasta la adultez, en donde se localiza en los somas y superficie de las células de Pk maduras y en el árbol dendrítico bajo la forma de un puntillado discreto en toda la extensión de la CM. El patrón de la subunidad α1 observado en el cerebelo en desarrollo es dinámico pero focalizado principalmente en las células de Pk.





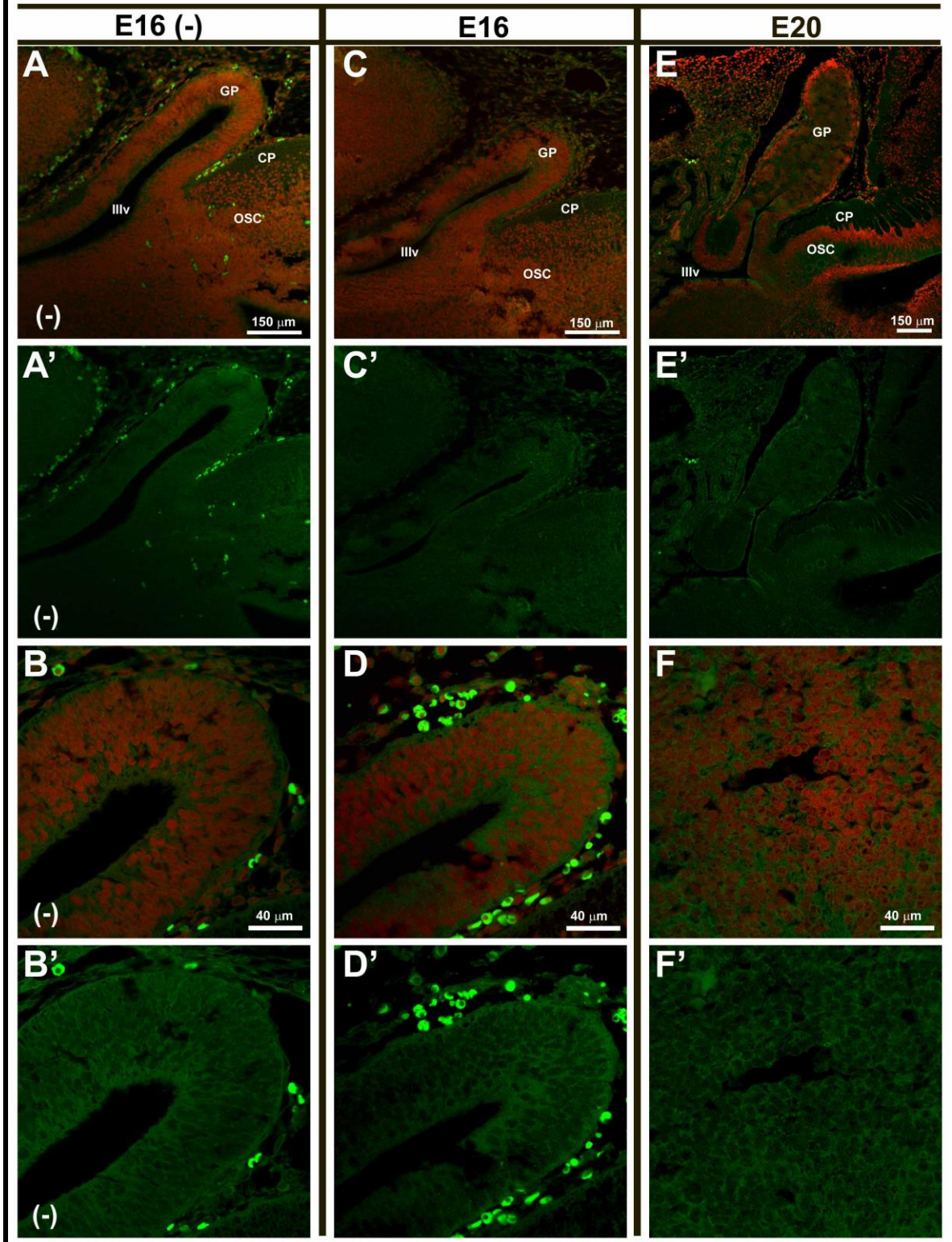
**FIG. 10: RGABA<sub>A</sub>α1 en el cerebelo en desarrollo.**

A-D') IHQ para RGABA<sub>A</sub>α1 (verde) en distintos estadios del desarrollo del cerebelo. Los núcleos están marcados con yoduro de propidio (IP; rojo). A-A') E20, no se detectó señal del receptor. B-B') P3, pudimos observar claramente la localización del receptor en las células de Pk en desarrollo (flecha blanca). C-C') P7, el receptor acompaña el desarrollo de los arboles dendríticos (flecha amarilla) de las células de Pk, las que comienzan a orientarse. Son detectables algunas células con marca para el RGABA<sub>A</sub>α1 en la CGI (cabeza de flecha). D-D') Adulto, la señal se localiza en los somas y posiblemente las membranas de las células de Pk (flecha blanca e *inset*) y dispersa en forma de un puntillado discreto en los árboles dendríticos (flecha amarilla) que se extienden en toda la CM. Microscopía confocal. A-C') 60X. D-D') 60X, más zoom de 1X.

**La subunidad RGABA<sub>A</sub>α1 no fue detectada en el desarrollo embrionario ni neonatal de la glándula pineal**

Realizamos un barrido en todo el desarrollo de la GP utilizando el anticuerpo específico contra la subunidad α1 y no pudimos detectarla en el tejido glandular. Como mencionamos anteriormente, en cerebelo la pudimos observar recién en los estadios posnatales. En la FIG. 11 se presentan, a manera de ejemplo, dos estadios embrionarios, uno temprano (E16) y otro tardío (E20) para mostrar la ausencia de señal. El control negativo del E16 se muestra en la figura para definir el nivel de *background* propio de la técnica (FIG. 11 A-B').

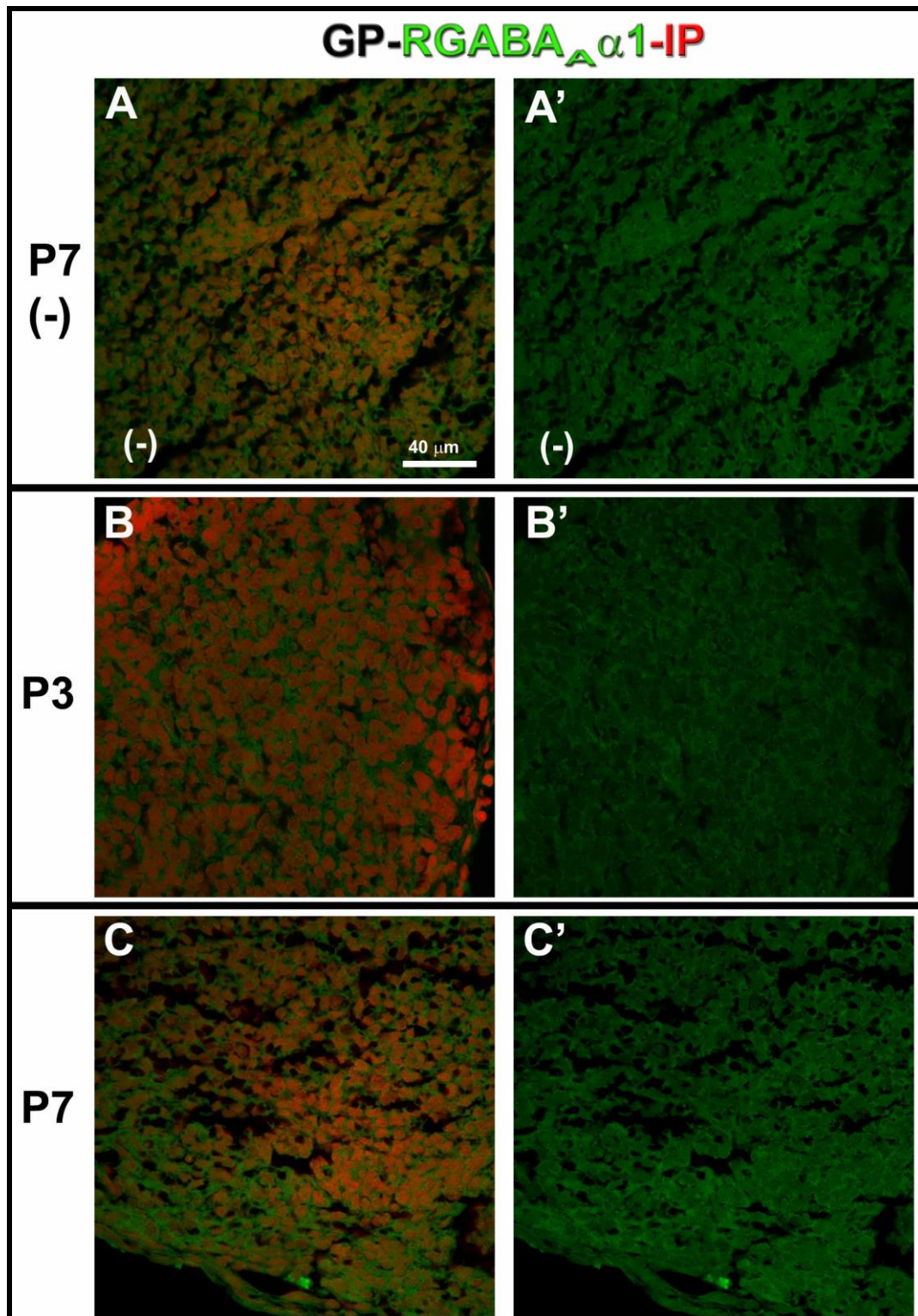
# GP-RGABA<sub>A</sub>α1-IP



**FIG. 11: RGABA<sub>A</sub>α1 está ausente en la GP embrionaria.**

IHQ para RGABA<sub>A</sub>α1 en la GP de embriones E16 y E20. Núcleos visualizados con IP (rojo). A-B') Control negativo sin anticuerpo primario. Primordio pineal E16 a bajo aumento (A-A') y a mayor magnificación (B-B'). C-F') E16 y E20, el primordio no presenta marca para el receptor. CP: comisura posterior. OSC: órgano subcomisural. IIIv: tercer ventrículo. Microscopía confocal. A-A' y C-C') 20X. E-E') 10X. B-B', D-D' y F-F') 60X.

La expresión de la RGABA<sub>A</sub>α1 en estadios posnatales sigue sin ser detectada en la GP. En la FIG. 12 A-A' se muestra un control negativo sin anticuerpo primario en una GP P7. Luego se muestran dos glándulas en P3 y P7, la señal no sobrepasa el nivel del control negativo (FIG. 12 B-C').



**FIG. 12: RGABA<sub>A</sub>α1 no fue localizada en la GP neonatal.**

A-C') IHQ para RGABA<sub>A</sub>α1 (verde) en GP neonatales P3 y P7. Núcleos marcados con IP (rojo). A-A') P7, control negativo por omisión de anticuerpo primario. B-C') P3 y P7, respectivamente; no se observa marcación para el receptor. Microscopía confocal. A-C') 60X.

## RGABA<sub>B</sub>1 en el cerebelo en desarrollo

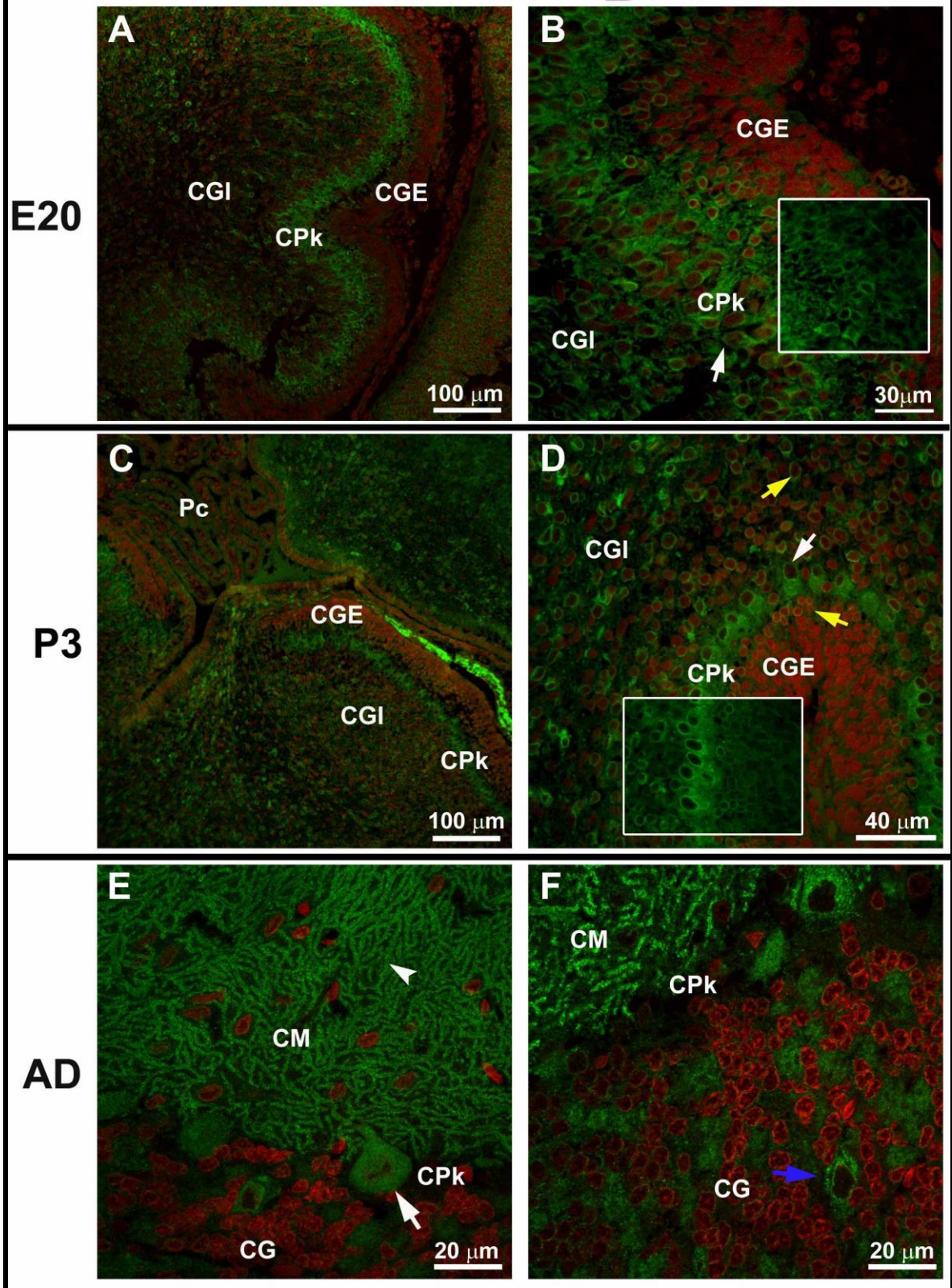
De la misma manera que se planteó para el análisis de las RGABA<sub>A</sub>α1, el cerebelo fue elegido como control de especificidad y referencia para la RGABA<sub>B</sub>1. En el análisis de la distribución de este receptor nos centramos en las regiones que rodean al primordio pineal y el cerebelo.

En cerebelo logramos detectar a RGABA<sub>B</sub>1 en estadíos tempranos del desarrollo embrionario y lo pudimos seguir por los periodos neonatales y adulto, esto nos reveló una interesante dinámica que probablemente tenga importantes implicancias en el desarrollo de dicho órgano. En la FIG. 13 se muestran tres estadíos del desarrollo del cerebelo (E20, P3 y adulto) que nos permiten visualizar el momento en que las células granulares adquieren su expresión y como varía la localización del mismo a medida que madura el órgano. El cerebelo en E20 está en plena formación y recibe las corrientes celulares que originarán las capas granulares y la de Pk. En la CGE las células más externas son más proliferativas y a medida que migran en forma tangencial-centrípeta hacia el interior, se van diferenciando y su morfología cambia. Al parecer uno de los cambios que acompaña la diferenciación es la adquisición gradual de RGABA<sub>B</sub>1. Podemos observar expresión del receptor en las células de la parte más interna de la CGE no así en las más externas (FIG. 13 A-B). Esto podría indicar que mientras las células migran tangencialmente desde las regiones neurogénicas no expresarían el receptor, pero cuando comienzan a diferenciarse se activaría su expresión. Pasando el nivel de la capa de células de Pk, en la CGI propiamente dicha, las células granulares también contienen altos niveles del receptor. Por su parte, los precursores de las células de Pk también presentan una fuerte expresión de la subunidad B1 y se agrupan en varias filas entre la CGI y la CGE. El cerebelo prosigue su diferenciación y maduración en estadíos posnatales y la CGE se puede detectar hasta P15 inclusive. Por lo tanto, el cerebelo P3 mantiene aún fuertes corrientes de células que se dividen y diferencian en la CGE y migran hacia el interior de la masa cerebelar atravesando la línea de células de Pk, la cual en este estadío ya comienza a transformarse en una monocapa (FIG. 13 C-D). El receptor en este estadío mantiene un patrón similar al embrionario, aunque al estar las capas cerebelares mejor definidas, se puede apreciar bien como las células granulares comienzan a expresarlo en región más interna de la CGE (FIG. 13 D, recuadro). Además, la expresión del receptor en la CGI es más heterogénea que en los

estadios embrionarios, pudiéndose observar desde células fuertemente marcadas hasta algunas que carecen de señal. Esto podría indicar que las células granulares pierden gradualmente al receptor cuando completan su migración. En el cerebelo adulto la localización de la RGABA<sub>B1</sub> cambia significativamente y se concentra solo en las poblaciones GABAérgicas, como se puede apreciar en las imágenes E y F de la FIG. 13. El árbol dendrítico de las células de Pk resulta perfectamente delineado por la presencia de la subunidad B1, así como sus somas y algunas células de la CG, que probablemente sean las de Golgi II, de naturaleza también GABAérgicas. Nos resultó interesante que desde los estadios embrionarios las poblaciones celulares que se suponen GABAérgicas expresan receptores de GABA, lo que indica que el GABA cumpliría una importante función paracrina/autocrina en la diferenciación de estas células. Otro aspecto importante de este análisis, es que la expresión de la B1 en las células granulares glutamatérgicas es transiente ya que la observamos en una ventana temporal definida.

En cerebelo, el anticuerpo utilizado demostró su capacidad de detectar específicamente la localización dinámica de la RGABA<sub>B1</sub>, sugiriendo que dicha subunidad podría estar involucrada en el proceso de diferenciación celular. De esta manera, el cerebelo pasó de ser un órgano control para la técnica de IHQ, a un importante modelo para poder interpretar los resultados obtenidos en la GP.

# Cer-RGABA<sub>B</sub>1-IP





**FIG. 13: RGABA<sub>B</sub>1 en el desarrollo del cerebelo.**

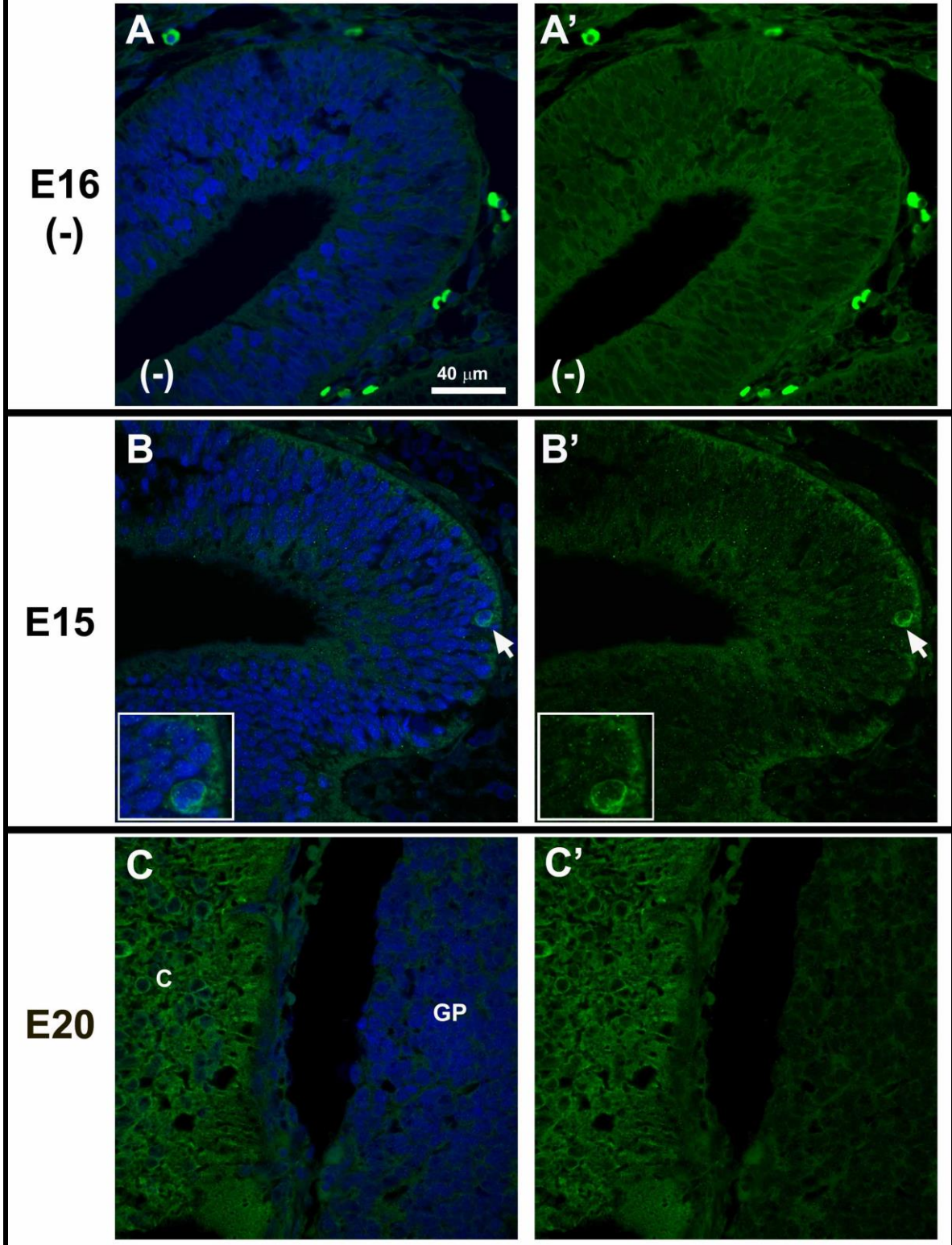
A-F) IHQ para el RGABA<sub>B</sub>1 (verde) en cerebelo embrionario, neonatal y adulto. Los núcleos son marcados con IP (rojo). A y B) Cerebelo E20 a diferentes aumentos; la marca del receptor se destaca en las células de Pk embrionarias (flecha blanca). Las células más externas de la CGE, zona proliferativa, no presentan marca, pero las de la zona de diferenciación en contacto con la CPk adquieren gradualmente el receptor en sus membranas. El recuadro en B muestra solo el canal verde y permite visualizar este fenómeno claramente. C y D) Cerebelo P3 con diferentes aumentos; el receptor se localiza en los somas de un gran número de células como puede visualizarse en C, aunque las que más sobresalen son las de la CPk. A mayor aumento se puede apreciar como las células de la CGE adquieren la marca paulatinamente al igual que en E20 (D, recuadro). E y F) Cerebelo adulto; la RGABA<sub>B</sub>1 se localiza en toda la extensión del árbol dendrítico de las células de Pk (cabeza de flecha) y en sus somas (flecha blanca). En la CG la marca no se localiza en las células granulares, sino en unas pocas células que aparentemente son las de Golgi II (F, flecha azul). Pc: plexos coroideos. Microscopía confocal. A y C) 20X, más zoom de 1X. B) 60X. D) 60X, más zoom de 1X. E y F) 100X.

**RGABA<sub>B</sub>1 en el desarrollo embrionario de la glándula pineal**

No se observó señal para el RGABA<sub>B</sub>1 en las células que conforman la GP embrionaria desde el primordio hasta su estado globular. Sí se encontraron algunas células aisladas con expresión de este receptor dentro de la GP en formación, no obstante su morfología no se correspondía con las células neuroepiteliales o parenquimales (FIG. 14 B-B', *inset*). En principio, pensamos que se trataría de una célula tipo microglial invadiendo la GP desde las meninges.

En la FIG. 14 se muestra un control negativo (A-A') donde puede apreciarse el nivel de *background* propio de la técnica y dos estadios representativos, uno temprano (E15) y otro tardío (E20). En el estadio E15 podemos observar que la evaginación que dará origen a la GP no posee marca para el receptor, excepto en la célula señalada en la imagen. En las imágenes C y C' de la FIG. 14 se muestra una región negativa de una GP de un embrión E20 junto a una zona de corteza vecina positiva para el receptor. Aun en E20 no fuimos capaces de detectar señal positiva en el estroma glandular.

# GP-RGABA<sub>B</sub>1-DAPI



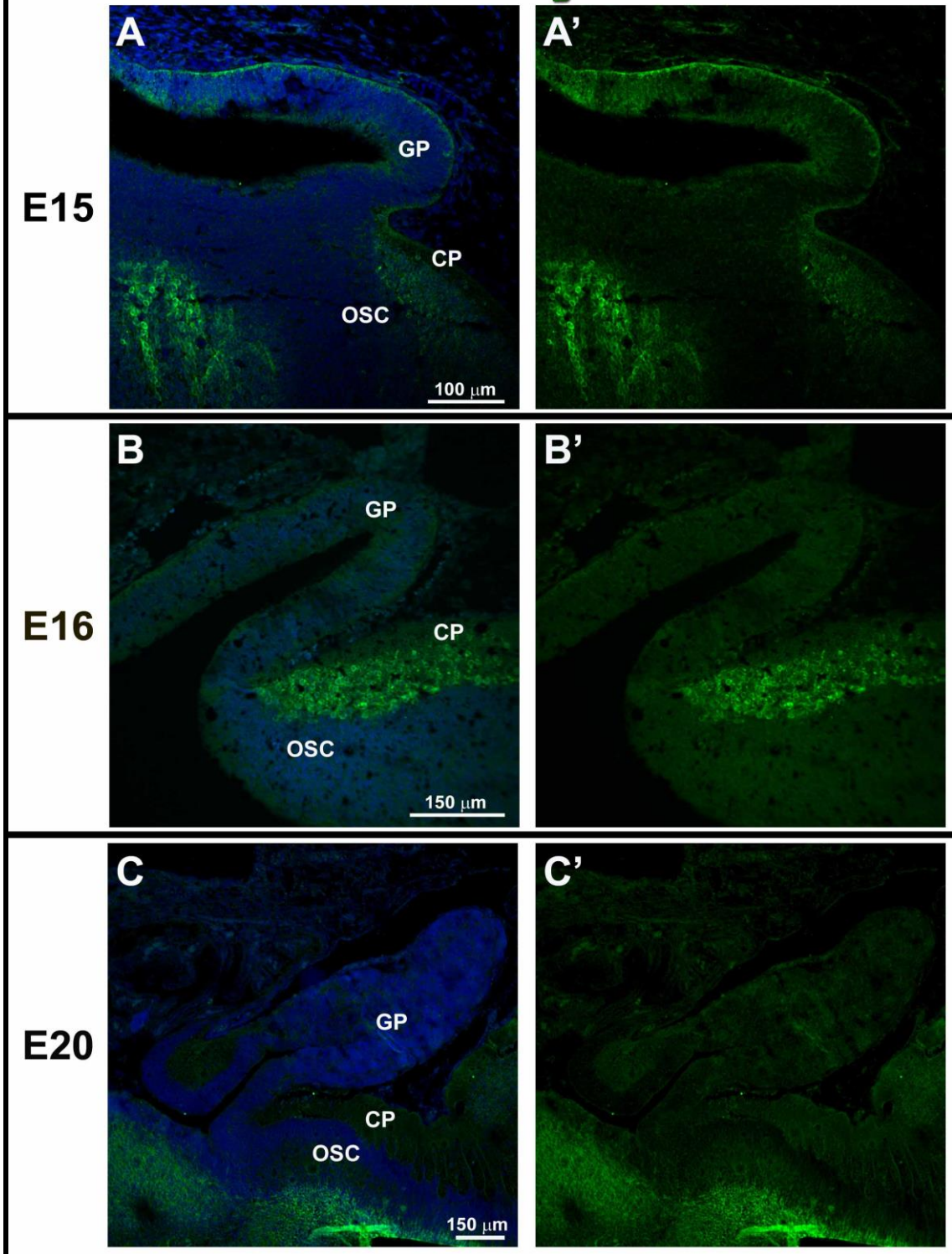
**FIG. 14: RGABA<sub>B</sub>1 está ausente en la GP embrionaria.**

A-C') IHQ para RGABA<sub>B</sub>1 en la GP de embriones E15, E16 y E20. Núcleos visualizados con DAPI (azul). A-A') Control negativo por omisión del anticuerpo primario en una GP E16. B-B') Primordio pineal E15 que muestra la ausencia de señal positiva. La flecha identifica una célula positiva en la región basal del neuroepitelio (*inset*). Se trataría, por su ubicación y morfología, de una célula de tipo microglial en proceso de invasión. C-C') Cerebro E20; la señal en la GP no supera el *background*, sin embargo en la corteza cerebral adyacente se puede ver claramente la expresión de la subunidad B1. C: corteza. Microscopía confocal. A-C') 60X. *Inset* en B-B', zoom de 2X.

**RGABA<sub>B</sub>1 en regiones cerebrales adyacentes a la glándula pineal embrionaria**

Por otro lado, fueron claramente detectables regiones adyacentes a la GP en formación que presentaban altos niveles de la RGABA<sub>B</sub>1. Se pudo visualizar que durante el desarrollo embrionario los dominios de expresión del receptor están muy bien definidos en poblaciones celulares discretas. En la FIG. 15 se muestran tres estadíos embrionarios E15, E16 y E20 a bajo aumento, lo que nos permite apreciar a la GP en relación a regiones vecinas. En E15 y E16 se puede definir una población de células RGABA<sub>B</sub>1 positivas que se localiza inmediatamente posterior al primordio y dorsal a la región que dará origen al OSC. Tanto el primordio pineal como el OSC los definimos por el dominio de expresión de Pax6 como se muestra en la siguiente sección. En el estadío E20, la GP se encuentra más desarrollada y con forma globular y las poblaciones RGABA<sub>B</sub>1<sup>+</sup> se encuentran más internamente en el tejido nervioso por debajo del OSC. La distribución del receptor en estas regiones es muy interesante y sugiere que el GABA podría estar regulando la ontogenia de estas poblaciones celulares en particular.

# GP-RGABA<sub>B</sub>1-DAPI



**FIG. 15: RGABA<sub>B</sub>1 en regiones adyacente a la GP embrionaria.**

A-C') IHQ para RGABA<sub>B</sub>1 en cerebros de embriones E15, E16 y E20. Núcleos visualizados con DAPI (azul). A-A') Primordio pineal E15 a bajo aumento, se pueden observar claramente dos regiones en el tejido nervioso adyacente con alta expresión del receptor. Una de ellas se encuentra ubicada dorsalmente al OSC y otra en una región más profunda. B-B') En E16 seguimos detectando la población positiva por arriba del OSC, pero la región profunda no se visualiza, probablemente por el nivel al que se realizó el corte histológico. C-C') En E20 podemos observar una gran región más profunda con alta expresión del receptor. Microscopía confocal. A-A') 20X, más zoom de 1.5X. B-B') 20X, más zoom de 1.3X. C-C') 10X.

## Relación Pax6-RGABA<sub>B</sub>1 en el periodo embrionario

A continuación se buscó relacionar la distribución de los RGABA<sub>B</sub>1 con el marcador de diferenciación de la GP, Pax6. Esta relación resultó ser muy interesante tanto en el desarrollo embrionario como en el adulto.

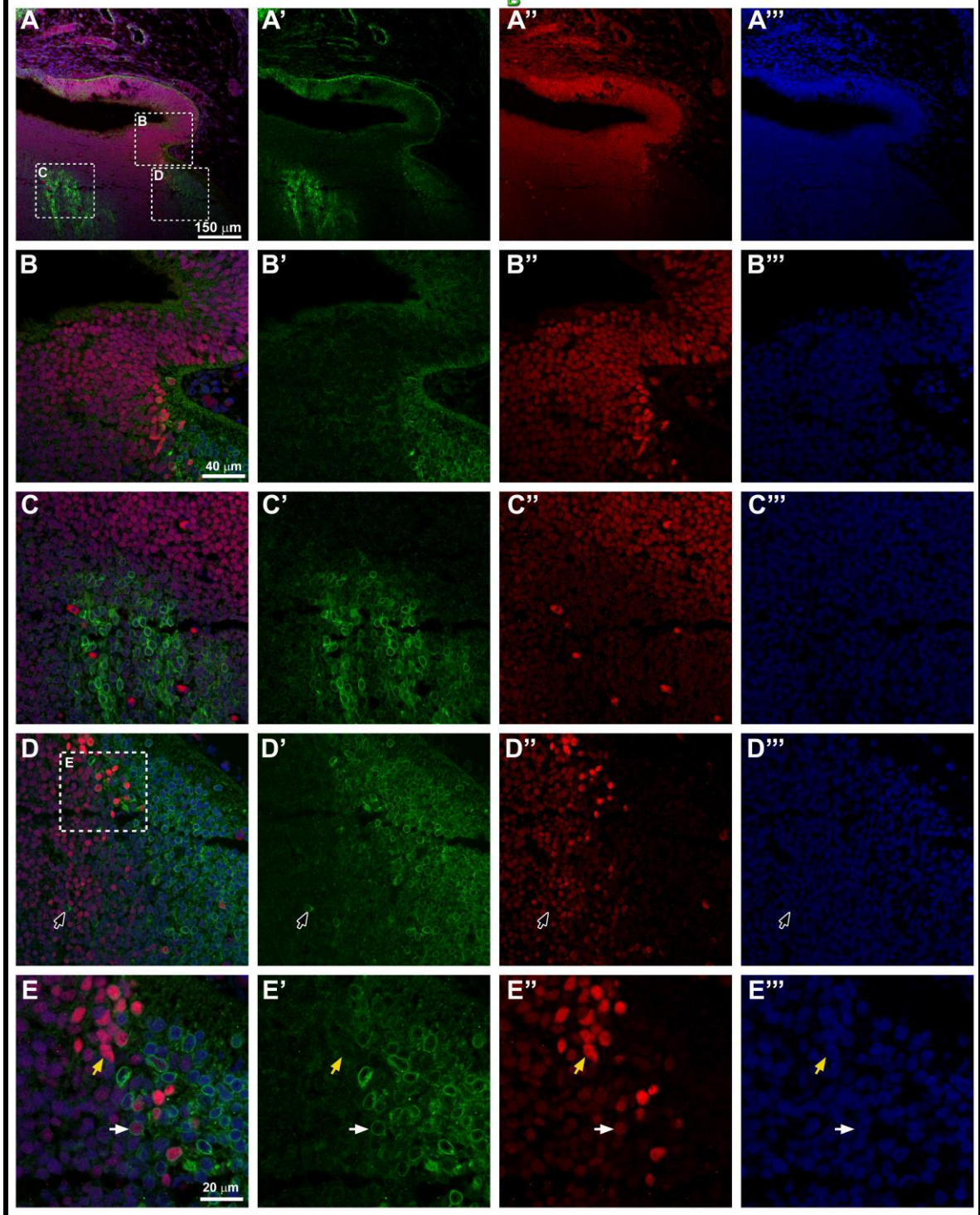
Como mencionamos anteriormente, en el periodo embrionario, la GP expresa Pax6 en casi todas las células y no presenta niveles detectables de RGABA<sub>B</sub>1. Al trabajar con cortes de cerebro entero, pudimos evaluar más allá de la pineal y apreciar cómo se relaciona con el tejido nervioso circundante (FIG. 16). Un fenómeno muy interesante que pudimos observar es que Pax6 presenta un gradiente espacial en los niveles de expresión, los cuales son máximos en las regiones precursoras de la pineal y el OSC, y disminuyen gradualmente hasta ser prácticamente indetectables en el tejido nervioso circundante (el patrón descrito puede apreciarse en la FIG. 16 A''). Nos resultó interesante que el gradiente espacial de Pax6 es más gradual en algunas regiones como la indicada en el recuadro C de la FIG. 16 A, que en otras como la del recuadro en D.

Cuando analizamos simultáneamente la localización de Pax6 y RGABA<sub>B</sub>1, observamos claramente que guardan una relación inversa; donde comienza a reducirse la expresión del factor de transcripción se inicia la de la subunidad del receptor (FIG. 16). En base a estos dos marcadores se pudieron diferenciar claramente dos poblaciones celulares, una Pax6<sup>+</sup>/RGABA<sub>B</sub>1<sup>-</sup> y otra Pax6<sup>-</sup>/RGABA<sub>B</sub>1<sup>+</sup>, separadas por una zona de transición. Las

poblaciones celulares que discriminan estos marcadores y los límites que establecen, se pueden visualizar también por su organización y una morfología nuclear diferencial. Esto último se hace evidente con DAPI ya que los núcleos de las células que expresan el receptor se ven laxos, más grandes y espaciados que los Pax6 positivos (FIG. 16 B''', C''', D''' y E''').

Es interesante que algunas células con expresión del receptor se localizan ocasionalmente en la región de las células Pax6 positivas, pero no expresan este factor de transcripción (FIG. 16 D-D'''). Además en las regiones limítrofes entre las poblaciones celulares pudimos observar unas pocas células con una alta expresión del factor de transcripción en sus núcleos que interrumpen en el gradiente descrito de Pax6 y presentan expresión de  $\text{RGABA}_B1$  (FIG. 16 E-E'''). Según el patrón observado, la relación entre estas dos moléculas posiblemente esté involucrada en el establecimiento de subtipos celulares y sugiere que el GABA podría tener un rol importante como morfógeno.

GP E15-RGABA<sub>B</sub>1-Pax6-DAPI



**FIG. 16: Relación entre Pax6 y RGABA<sub>B</sub>1 en regiones adyacentes a la GP embrionaria.**

A-E''') Doble IHQ para RGABA<sub>B</sub>1 (verde) y Pax6 (rojo) en cerebro de embrión E15. Núcleos marcados con DAPI (azul). A-A''') Primordio pineal E15 a bajo aumento, se pueden visualizar las poblaciones celulares con alta de expresión de Pax6 y las de alto nivel de RGABA<sub>B</sub>1. Los recuadros marcan las regiones ampliadas en B-B''', C-C''' y D-D'''. En las imágenes a mayor magnificación se puede apreciar la disminución gradual de Pax6 y en contraposición el aumento de la señal del receptor. D-D''') La flecha negra con borde blanco señala una célula Pax6/RGABA<sub>B</sub>1<sup>+</sup> en el dominio de la población Pax6<sup>+</sup>. E-E''') Las ampliaciones del recuadro en D muestra una región límite entre las dos poblaciones donde algunas células muestran una expresión elevada de Pax6 que interrumpen en el gradiente mencionado con (flecha amarilla) y sin expresión del receptor (flecha blanca). En el canal azul, note la morfología diferencial y la disposición más espaciada de los núcleos de las células RGABA<sub>B</sub>1<sup>+</sup> con respecto a los de la población de mayor expresión de Pax6. Note el aumento en la expresión del receptor en las células ubicadas en los límites inmediatos de la población Pax6<sup>+</sup>. Microscopía confocal. A-A''') 20X. B-D''') 60X. E-E''') 60X, más zoom de 2X.

## Relación Pax6-RGABA<sub>B</sub>1 en el desarrollo del cerebelo

En las FIGS. 6, 13 y 17 se muestran cerebelos en diferentes estadios del desarrollo donde se puede apreciar el progreso de estratificación del órgano. Por lo tanto, para comprender el análisis que se detalla a continuación se debe tener en cuenta que la génesis de las células granulares glutamatérgicas se puede seguir a través de la ubicación y morfología nuclear, y que el nivel de diferenciación de las mismas tiene relación con el sitio donde se encuentran dentro de los estratos cerebelares.

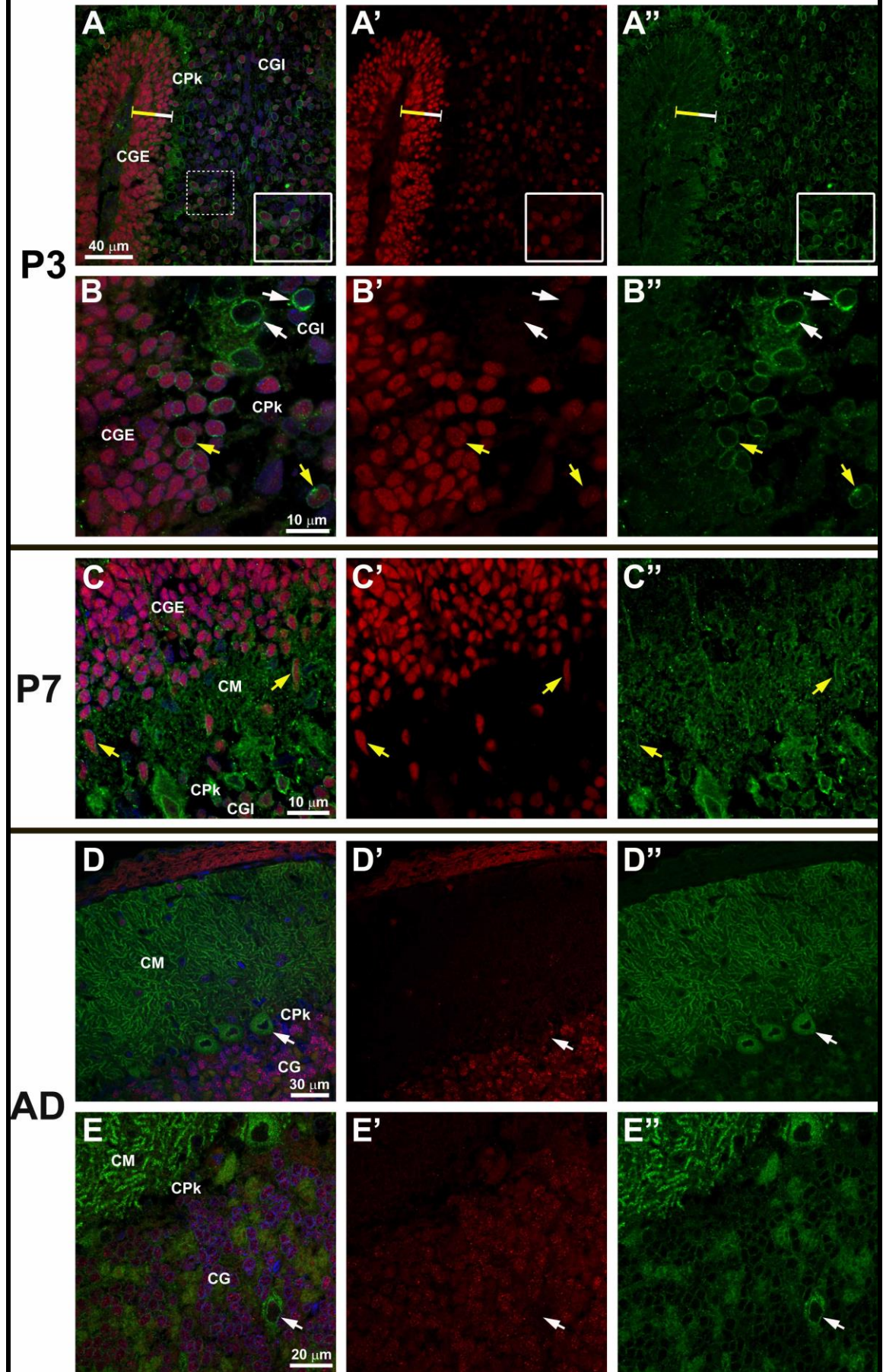
En la doble IHQ Pax6/RGABA<sub>B</sub>1 en el cerebelo en desarrollo se puede apreciar la relación que existe entre el factor de transcripción y la subunidad metabotrópica. Pax6 se expresa en todos los precursores de las células granulares en la CGE y en la CGI. Las células más externas (proliferativas) de la CGE son indiferenciadas, con núcleos más grandes y laxos y no expresan RGABA<sub>B</sub>1. Las células de la capa más interna de la CGE poseen núcleos más pequeños y compactos, y presentan la subunidad del receptor (FIGS. 6 y 17). Es decir que la adquisición del receptor se produce en las células que comienzan a diferenciarse y deben continuar su migración centripeta hacia la CGI. Los precursores granulares Pax6<sup>+</sup> mantienen la expresión del receptor mientras continúan su diferenciación



y migran a través de la CM hacia la CGI, atravesando la CPk productora de GABA. Tanto la expresión de Pax6 como la del receptor se vuelve heterogénea en la CGI (FIGS. 13 A-D y 17 A), lo que sugiere que las células que llegan a esta capa perderían la expresión de ambos. Por su parte, las futuras células de Purkinje no expresan Pax6 y contienen una alta concentración de la subunidad B1 (FIGS. 13 y 17 A-B''). En P3 se puede apreciar claramente que las células que empiezan a expresar el receptor provienen de la oleada migratoria de las células granulares ya que mantienen la expresión del factor de transcripción (FIG. 17 B-B''). En el cerebelo en estadio P7, donde se puede diferenciar mejor la CM en formación, se observan células con morfología claramente migratoria que conservan la marca para el receptor y al Pax6 en sus núcleos (FIG. 17 C-C'').

Dentro de la CGI del cerebelo P3, encontramos células granulares que presentan niveles variables de Pax6 y de RGABA<sub>B1</sub> (FIG. 17 A-A''). De esta manera, en la CGI podemos encontrar células con altos niveles de Pax6 y del receptor y otras con bajo nivel de ambos. Esta observación es importante ya que al analizar el cerebelo adulto encontramos que las células granulares maduras han perdido la expresión del receptor y los niveles de Pax6 son casi indetectables (FIG. 17 E-E''). Por lo tanto, la expresión transiente del RGABA<sub>B1</sub> en las células granulares descrita anteriormente en la FIG. 13, tendría relación con el nivel de Pax6 en sus núcleos. Este dato es importante de tener en cuenta para el análisis siguiente de la relación Pax6-RGABA<sub>B1</sub> en la pineal neonatal y adulta.

**Cer-RGABA<sub>E</sub>1-Pax6-DAPI**



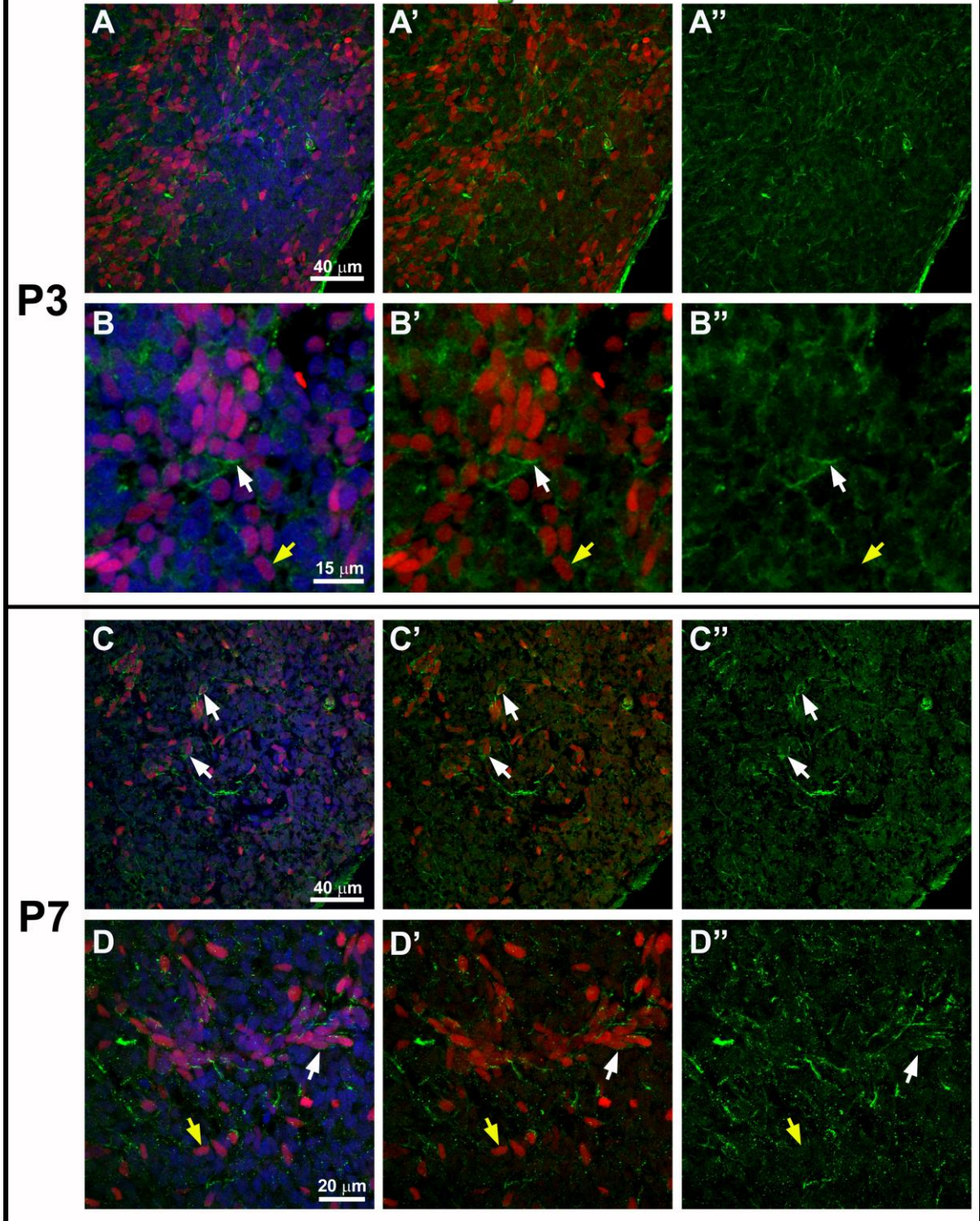
### **FIG. 17: Relación entre Pax6 y RGABA<sub>B</sub>1 en el desarrollo del cerebelo**

A-E'') Doble IHQ para RGABA<sub>B</sub>1 (verde) y Pax6 (rojo) en el cerebelo posnatal y adulto. Núcleos marcados con DAPI (azul). A-A'') Cerebelo P3 a bajo aumento donde se puede apreciar la distribución de Pax6 en relación a RGABA<sub>B</sub>1 en las diferentes capas cerebelares. El grosor de la CGE ha sido señalado por una línea, donde la porción amarilla indica la región más proliferativa e indiferenciada con núcleos más grandes y laxos que los de las células más internas de esa capa (porción blanca) que estarían más avanzadas en su diferenciación. La región marcada con el recuadro punteado se muestra en el *inset* a la derecha, donde se puede apreciar en una zona de la CGI a células granulares con diferentes niveles expresión de la subunidad del receptor y del factor de transcripción. B-B'') Cerebelo P3 a mayor aumento, note que Pax6 se expresa en todas las células de la CGE y no se pierde completamente al adquirir la expresión del receptor (flecha amarilla). Las células de Purkinje son negativas para Pax6 y presentan una fuerte señal del receptor al igual algunas células de la CGI (flechas blancas). C-C'') P7, se pueden apreciar células Pax6<sup>+</sup> con el receptor migrando por la CM (flechas amarillas). D-E'') Adulto, RGABA<sub>B</sub>1 se localiza en el árbol dendrítico y soma de las células de Pk y en las Golgi II de la CG (flechas blancas). Las células granulares expresan un nivel muy bajo de Pax6 y perdieron la expresión del receptor. Microscopía confocal. A-A'') 60X, más zoom de 1.6X. B-B'') 100X, más zoom de 2X. C-C'') 60X, más zoom de 1.5X. D-D'') 60X. E-E'') 100X.

## **Localización de la RGABA<sub>B</sub>1 en la glándula neonatal**

Logramos detectar a la RGABA<sub>B</sub>1 en la GP a partir de los primeros estadios neonatales. En P3 y P7 pudimos visualizar células con un alto contenido del receptor que a su vez presentaban Pax6 en sus núcleos (FIG. 18). En P3, como se analizó anteriormente, muchas células siguen siendo Pax6<sup>+</sup> y aunque su número se va reduciendo progresivamente a medida que madura el órgano, aún en el adulto se mantienen en una cantidad considerable (FIG. 6). Comparando las imágenes del estadio P3 con el P7, el número de células Pax6 disminuye, pero pareciera aumentar la proporción de las Pax6<sup>+</sup>/RGABA<sub>B</sub>1<sup>+</sup> sobre las Pax6<sup>+</sup>/RGABA<sub>B</sub>1<sup>-</sup>. Es probable que exista una relación entre las células Pax6<sup>+</sup> que se mantienen hasta la adultez y la localización del RGABA<sub>B</sub>1, como veremos en el siguiente Capítulo.

GP-RGABA<sub>B</sub>-1-Pax6-DAPI



**FIG. 18: RGABA<sub>B</sub>1 en la GP neonatal**

A-D'') Doble IHQ para RGABA<sub>B</sub>1 (verde) y Pax6 (rojo) en la GP en estadios neonatales. Núcleos visualizados con DAPI (azul). A-A'') GP P3 a bajo aumento, se puede apreciar la distribución del factor de transcripción y el receptor. Se observan agrupamientos de células Pax6<sup>+</sup> con abundante marca para el receptor. B-B'') A mayor magnificación se aprecia que aunque algunas células con Pax6 en sus núcleos presentan una señal para el receptor (flecha blanca), la mayor parte sólo expresa al factor de transcripción (flecha amarilla). C-D'') GP P7, la localización de los marcadores mantiene la misma relación aunque se visualizan menos células expresando sólo Pax6 (flecha amarilla). Microscopía confocal. A-A'') 60X, más zoom de 1X. B-B'') 60X, más zoom de 3.4X. C-C'') 60X, más zoom de 1X. D-D'') 100X, más zoom de 1X.

## **Capítulo II**

## Sistema GABAérgico en la glándula pineal de rata adulta.

Consideramos que darle identidad celular y tisular a los componentes del sistema GABAérgico en la GP de rata adulta es un paso esencial para el entendimiento de la participación de dicho sistema en la fisiología pineal. Por lo tanto, este fue uno de los objetivos de esta Tesis y será abordado en este Capítulo. Se utilizaron diversos marcadores celulares que nos permitieron asociar a la síntesis y recepción del GABA a grupos específicos de células en la GP adulta.

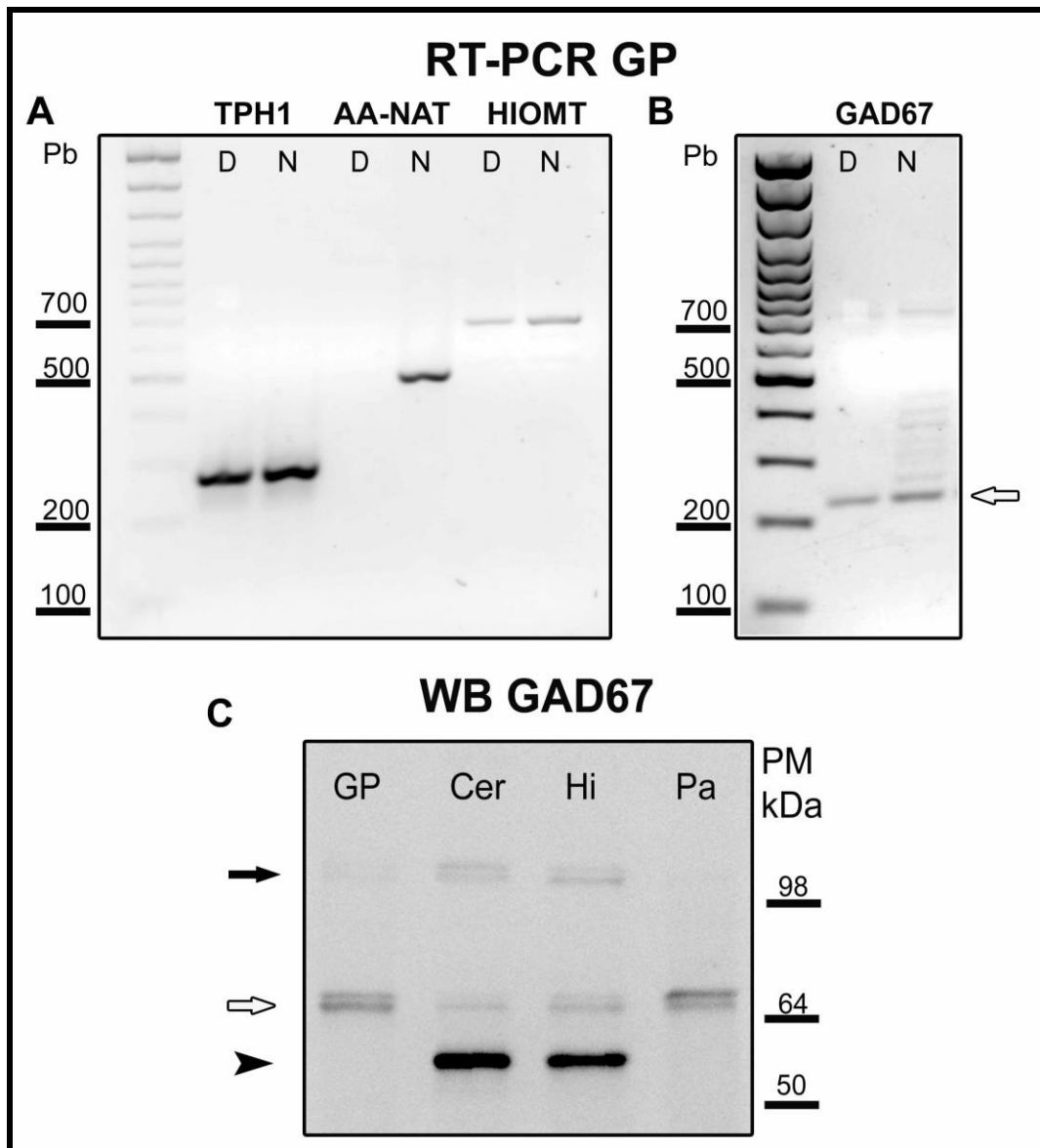
### GAD67 se expresa en el tejido glandular

En principio se buscó detectar la expresión del gen *Gad1* mediante la localización de su mensajero a través de la técnica de RT-PCR en muestras de GP adulta. Esta técnica fue capaz de mostrar la presencia y las variaciones diarias de componentes clásicos de la vía de síntesis de la melatonina. En la FIG. 19 A podemos observar las bandas específicas de los amplicones correspondientes a los mensajeros de las enzimas triptófano hidroxilasa 1 (TPH1), hidroxindol O-metiltransferasa (HIOMT) y AANAT en las cuales se puede apreciar sus variaciones entre el día (ZT6) y la noche (ZT18) para un ciclo L:O de 12:12, siendo la más evidente la de AANAT que es casi indetectable en la fase de luz. Las mismas muestras fueron utilizadas para buscar al mensajero de la enzima GAD67. En la FIG. 19 B se muestran las bandas específicas del amplicón esperado para GAD67, en niveles similares tanto para la muestra ZT6 como la ZT18. La presencia del mensajero de la GAD67 nos indica capacidad de la GP de generar GABA, lo que apoya la hipótesis de la existencia de células y/o fibras GABAérgicas a nivel glandular.

También se observó la presencia de la enzima GAD67 mediante la técnica de WB en extractos de GP adulta (FIG. 19 C). En la figura se muestra una membrana representativa con solo una calle de GP que corresponde a una muestra tomada a ZT14, sin embargo la banda también pudo detectarse en extractos de GP ZT6, aunque no pudo establecerse un ritmo por lo que no se incorporó a las figuras. Como control positivo se utilizaron cerebelo, páncreas e hipocampo ya que se sabe por bibliografía que presentan expresión de la enzima [221, 222]. En extractos de tejidos glandulares como páncreas y pineal, se obtuvo un doblete de bandas a nivel de los 67 kDa según el marcador de peso

molecular utilizado. Estas bandas son de considerable intensidad en ambos órganos, lo cual indica un nivel proteico importante (se sembraron 60 µg de proteína de la fracción citoplasmática para todas las muestras, ver Materiales y Métodos, pág. 43). Es importante tener en cuenta que el alto nivel observado de enzima podría deberse al aporte de terminales nerviosas GABAérgicas que penetran en la GP, como se discutirá más adelante. Tanto cerebelo como hipocampo presentaron un patrón de bandas distinto al de los tejidos glandulares. En los extractos de tejidos nerviosos se observaron tres bandas, de aproximadamente 110, 67 y 55 kDa (FIG. 19 C), las cuales ya han sido citadas anteriormente en la bibliografía. La banda de ~55 kDa ha sido descrita en sistema nervioso entérico e interpretada como un producto proteolítico de la GAD67 [223]. La banda de alto peso molecular también ha sido reportada anteriormente y se determinó que corresponde a un homodímero de la forma truncada de GAD67 [224]. Estas bandas son descritas en detalle en un artículo recientemente publicado por nuestro grupo [225].





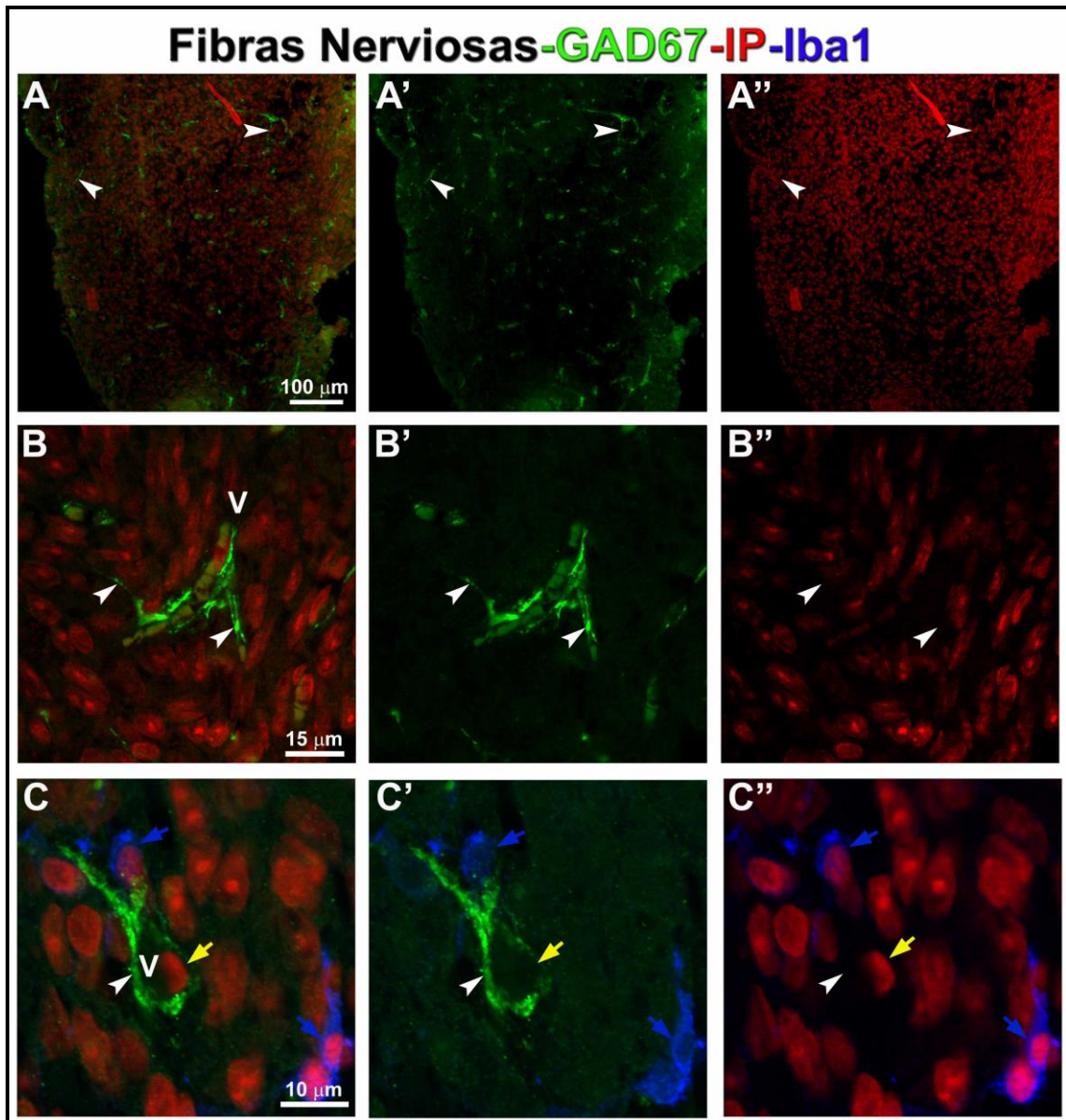
**FIG. 19: Presencia de GAD67 en la GP adulta.**

A-B) RT-PCR. A) Mensajeros de TPH1, AANAT e HIOMT en al día (D) y noche (N). B) Mensajero de GAD67 en D y N (la flecha marca la banda del tamaño esperado). En A y B se corrió paralelamente un marcador de fragmentos de 100 a 1000 pb. C) WB para GAD67 en extractos de GP, cerebelo (Cer), hipocampo (Hi) y páncreas (Pa). Los tejidos nerviosos presentan un patrón de tres bandas, una de ~55 (cabeza de flecha negra), 67 (flecha blanca) y 110 kDa (flecha negra) según el marcador de peso molecular (PM). En los tejidos glandulares el doblete alrededor de 67 kDa es la predominante. pb: pares de bases. kDa: kilodalton.

## Fibras GABAérgicas en la pineal adulta

Los resultados inmunohistoquímicos muestran que la GP recibe fibras GABAérgicas que penetran en el estroma y llegan hasta el centro del tejido con un marcado tropismo por los vasos sanguíneos (FIG. 20). Estas fibras contienen a la enzima GAD67 y son de un diámetro considerable, por lo que se las visualiza claramente atravesando el tejido y probablemente formen parte de la inervación central de la GP. Note que en las regiones por donde corren estas fibras no se observan núcleos a los cuales atribuirle la marca. En la FIG. 20 B-B' podemos ver un ejemplo de estas fibras en contacto con las paredes de un capilar (note los glóbulos rojos que quedaron atrapados en el interior del mismo). En la FIG. 20 C-C'' se puede observar una fibra GAD67<sup>+</sup> envolviendo un vaso en cuya pared se ubica un núcleo característico de célula endotelial, alrededor del cual hay un pequeño espacio GAD67 negativo. Interpretamos que este espacio corresponde al citoplasma de esta célula endotelial que no es GABAérgica. En azul están marcadas células de la microglía, que aunque están muy próximas a las fibras se pueden diferenciar de la marca verde de GAD67, lo que nos permite descartar a esas células como fuente de la enzima.

La localización de las fibras GAD67<sup>+</sup> nos hace suponer que la vasculatura podría ser blanco de la regulación GABAérgica. Existen varias referencias bibliográficas que indican que el GABA es un regulador activo de la circulación sanguínea en otros órganos, principalmente a nivel de la microvasculatura [120-125]. Cabe aclarar que no logramos marcar las fibras GABAérgicas con el anticuerpo contra GABA como lo hizo el de GAD67.



**FIG. 20: Fibras nerviosas GABAérgicas en la GP adulta.**

A-C'') IHQ para GAD67 (verde). Núcleos marcados con IP (rojo). A-A'') Imagen a bajo aumento de una GP adulta donde se pueden apreciar numerosas fibras GAD67<sup>+</sup> (cabezas de flechas). B-C'') Imágenes a mayor aumento de fibras estrechamente asociadas a vasos sanguíneos (V). Note los glóbulos rojos dentro del vaso en B. C-C'') Fibras GAD67<sup>+</sup> rodeando un pequeño vaso y una célula endotelial GAD67 negativa de su pared (flecha amarilla). En azul se marcan las células de la microglia GAD67 negativas (flechas azules). Microscopía confocal. A-A'') 20X. B-B'') 60X, más zoom de 2X. C-C'') 60X, más zoom de 2.5X.

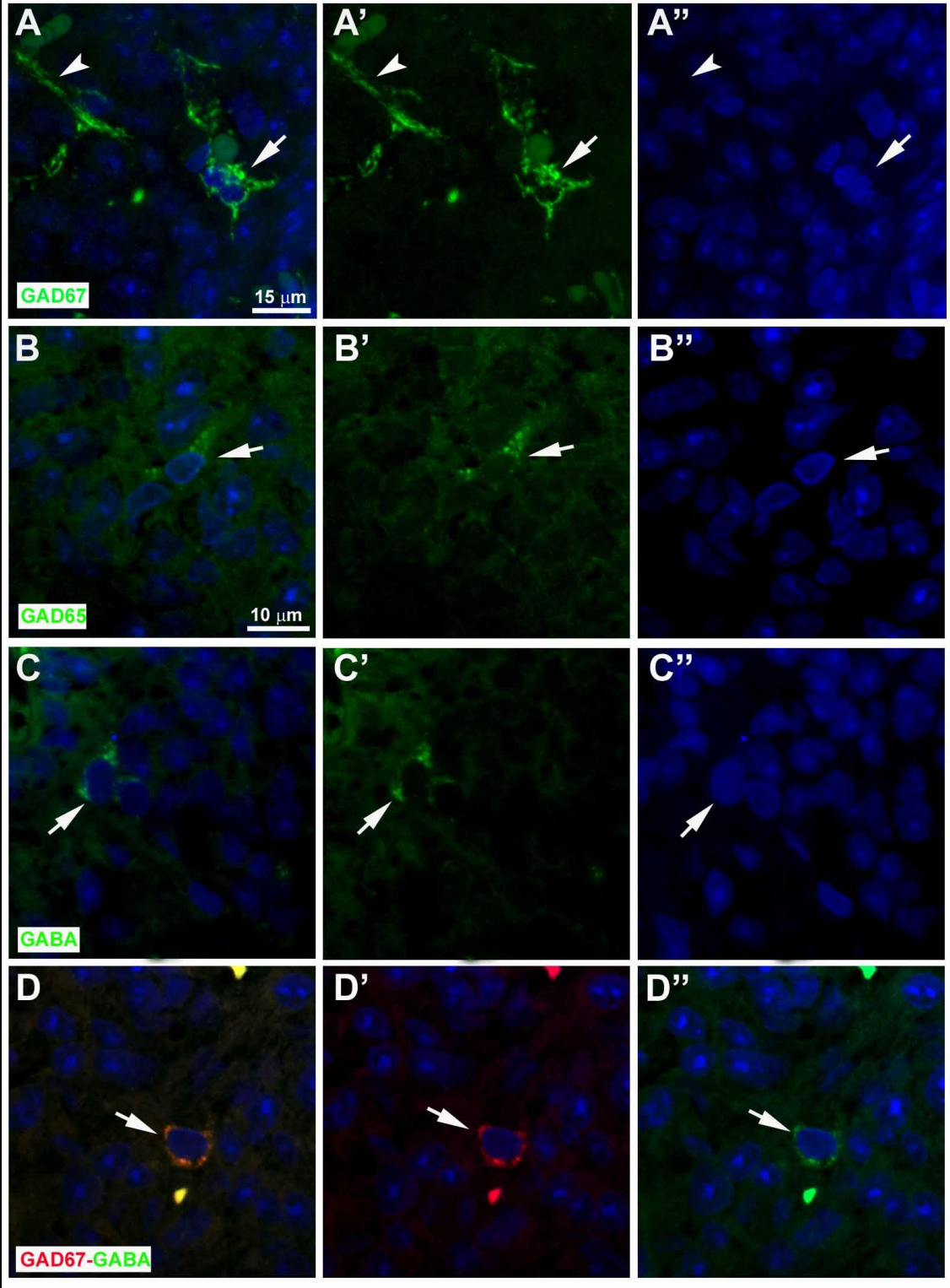
## Células GABAérgicas en la pineal adulta

Como mencionamos en la Introducción, existe referencia bibliográfica sobre la capacidad de las células de la GP para producir GABA. En el presente trabajo avanzamos sobre la caracterización y localización de éstas células en la GP de rata adulta.

Además de las fibras observadas, pudimos detectar una población de células GABAérgicas propia de la GP de rata adulta. Estas células se encuentran en número reducido y presentan morfología intersticial. Las definimos como GABAérgicas ya que expresan ambas enzimas biosintéticas, GAD67 y GAD65, y el anticuerpo anti-GABA localiza al transmisor en forma de finos gránulos en sus citoplasmas (FIG. 21 A-D''). Por IHQ doble, detectamos al GABA almacenado en células que expresaban la enzima GAD67 y ambas señales co-localizan en el mismo compartimiento intracelular, al menos al nivel de resolución del microscopio confocal (FIG. 21 D-D''). La explicación a dicha co-localización, podría ser que el transmisor es almacenado en microvesículas y la enzima se encuentra anclada a las membranas de las mismas, por esta razón las moléculas mantienen una proximidad que no es posible resolver con la microscopía utilizada. Estos resultados confirman que esta población celular efectivamente contiene las enzimas biosintéticas del GABA activa en su citoplasma. Estas células GABAérgicas fueron observadas en todos los ZT analizados y no parece variar su abundancia en muestras tomadas lo largo del ciclo L:O.

Tanto GABA como GAD67 son utilizados en el presente trabajo como marcadores de células GABAérgicas y sirvieron para realizar las cuantificaciones y la caracterización de estas células asociándolos a diversos marcadores.

# Marcadores GABAérgicos en Células DAPI



**FIG. 21: Células GABAérgicas en la GP adulta.**

A-D'') IHQ para distintos marcadores GABAérgicos. Núcleos marcados con DAPI (azul). A-A'') GAD67 (verde). B-B'') GAD65 (verde). C-C'') GABA (verde). D-D'') Doble marcación para GAD67 (rojo) y GABA (verde). Las células intersticiales GABAérgicas son señaladas con flechas blancas. Las cabezas de flechas señalan fibras GABAérgicas. Microscopía confocal. A-A'') 60X, más zoom de 2X. B-D'') 60X, más zoom de 2.5X.

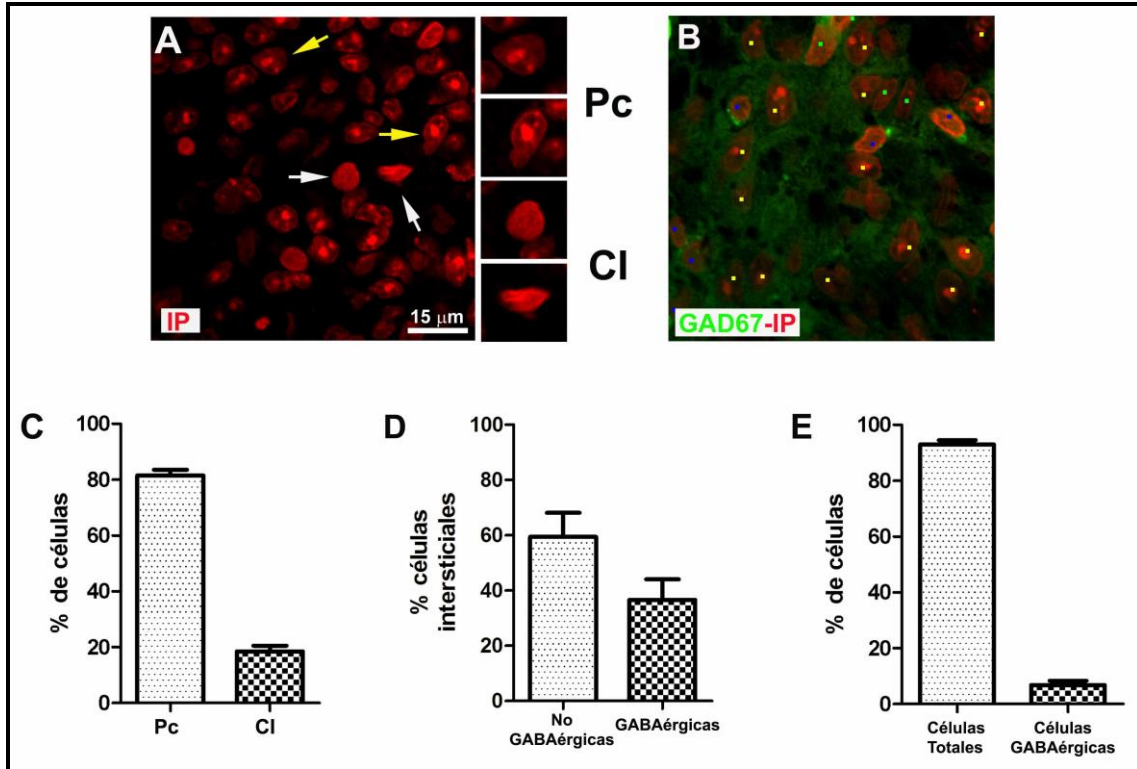
## Las células GABAérgicas representan una subpoblación de células intersticiales

En vista de que nuestros resultados ubican a la población de células GABAérgicas propias de la GP como una fracción de una población heterogénea de células intersticiales, nos propusimos poner el panorama en términos numéricos. Es importante notar que la morfología de los núcleos marcados con IP o DAPI nos permiten distinguir claramente entre pinealocitos y células intersticiales (FIG. 22 A). Los pinealocitos tienen núcleos más grandes con uno o más nucléolos prominentes, en cambio, los de las células intersticiales por lo general son más irregulares y compactos, lo que hace difícil distinguir estructuras nucleolares. Basándonos en la morfología nuclear y los marcadores GAD67 y GABA, clasificamos y cuantificamos las células de la GP de rata adulta.

Encontramos que la proporción de células intersticiales *versus* pinealocitos es mayor que la que figura en la bibliografía (20% con respecto al ~5% citado) (FIG. 22 C). Consideramos células intersticiales a las que presentan morfología nuclear y marcadores de linaje distintos a los pinealocitos. Se trata de un grupo heterogéneo conformado por células endoteliales, microglía, astrocitos y potenciales células precursoras.

Para realizar la cuantificación de células GABAérgicas en la GP de rata adulta, se utilizaron imágenes confocales de IHQ para GABA y GAD67. Para ambos marcadores detectamos dos patrones de señal en las células intersticiales, uno caracterizado por un puntillado disperso en el citoplasma y el otro por grumos grandes, irregulares y fuertemente marcados; este último patrón no coincide con la idea de microvesículas secretorias y no fue considerado en las cuantificaciones. Más adelante mostramos que el patrón de grandes grumos citoplasmáticos corresponde a células microgliales. En base a

imágenes obtenidas mediante microscopía confocal se determinó que aproximadamente el 40% de las células intersticiales son GABAérgicas (FIG. 22 D), lo cual representa aproximadamente un 5% del total de las células de la glándula pineal (FIG. 22 E).



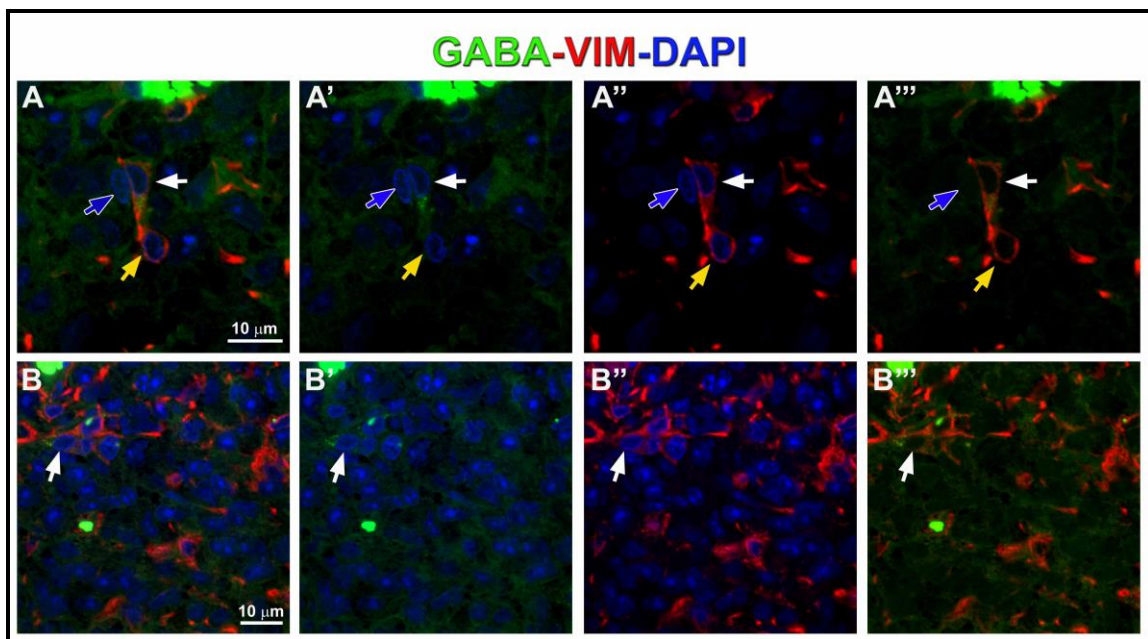
**FIG. 22: Cuantificación de células GABAérgicas en GP de rata adulta.**

A) Tinción de núcleos con IP en corte de GP adulta. Las flechas amarillas señalan los pinealocitos (Pc) y las blancas las células intersticiales (CI). En las ampliaciones se asocia cada tipo celular con su morfología nuclear, los Pc aparecen con uno o más nucléolos. B) Ejemplo de una imagen cuantificada utilizando la herramienta *cell counter* del programa *ImageJ*. Los puntos amarillos marcan Pc, los azules CI GAD67 positivas y los verdes negativas. Cuantificaciones: C) Pc versus CI. D) CI GABAérgicas (positivas para GABA y/o GAD67) versus CI no GABAérgicas. E) Células GABAérgicas versus células totales de la GP. A-B) Microscopía confocal. 60X, más zoom de 2X.

## Las células GABAérgicas representan una subpoblación vimentina positiva

Las células GABA<sup>+</sup> de la GP son ricas en VIM, un marcador de filamentos intermedios característico de astrocitos inmaduros y precursores neuronales y gliales en el

SNC [226-228]. Con la doble tinción GABA/VIM se pueden diferenciar al menos tres tipos de células intersticiales: células VIM/GABA positivas, células que expresan VIM pero no GABA y células que no expresan ninguna de las dos moléculas (FIG. 23 A-A'''). Todas las células que contenían GABA fueron positivas para VIM (FIG. 23 B-B'''). Esto indicaría que la población de células GABAérgicas es una subpoblación dentro de las intersticiales VIM positivas. Como es de esperar, las señales de GABA y VIM no colocalizan a nivel subcelular, consistente con la ubicación en microvesículas y formando filamentos intermedios, respectivamente.



**FIG. 23: Células GABAérgicas VIM positivas.**

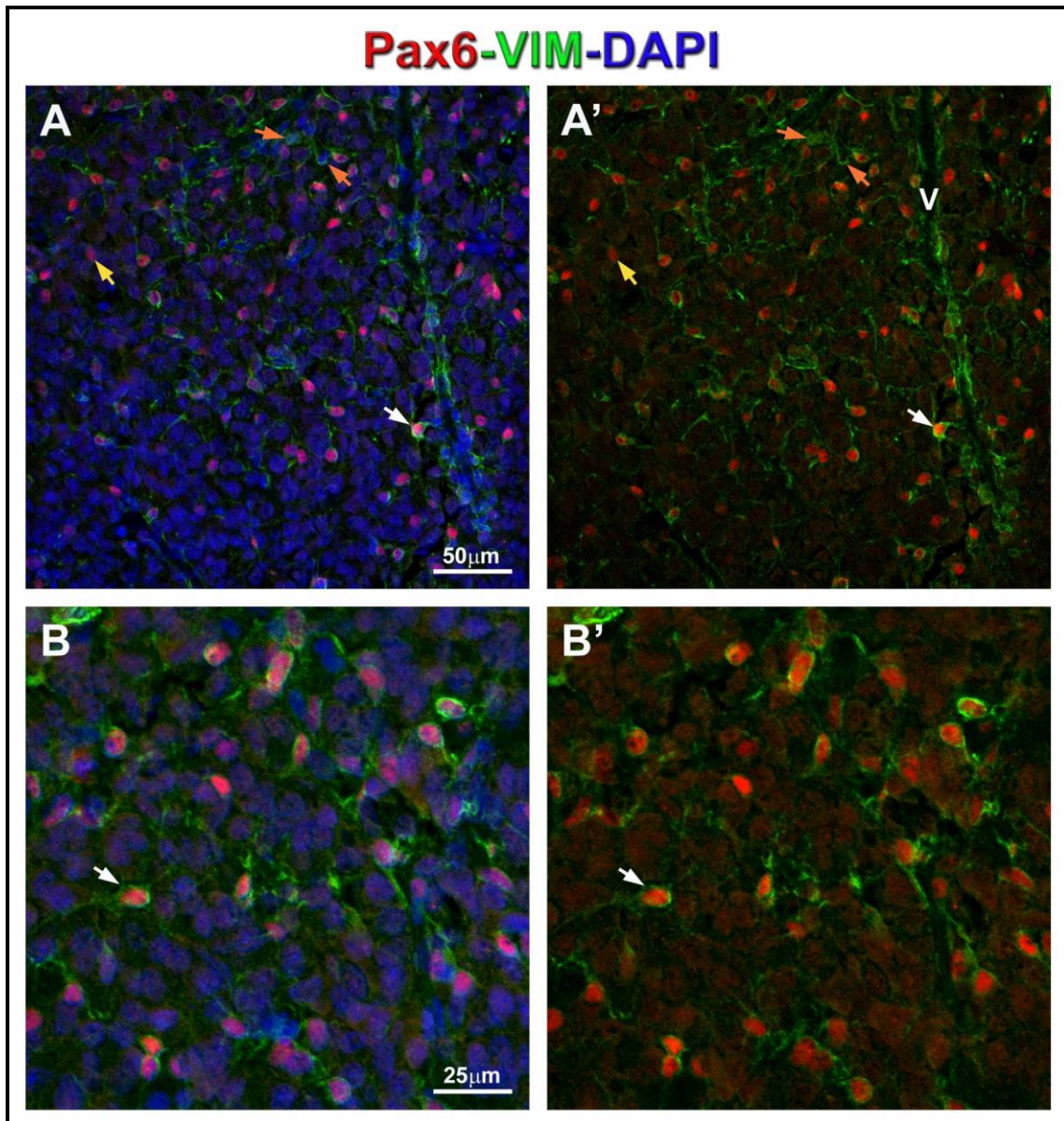
A-B''') IHQ doble para GABA (verde) y VIM (rojo). Flechas blancas: células intersticiales VIM y GABA positivas. Flecha amarilla: célula que expresa VIM pero no GABA. Flecha azul borde blanco: célula que no expresa ninguno de los dos marcadores. Microscopía confocal. A-A''') 60x, más zoom de 2.5X. B-B''') 60X, más zoom de 1.5X.

La expresión del marcador VIM presenta características particulares en la GP que no se observan en el resto del SNC. Los resultados generados por nuestro grupo son coincidentes con lo publicado por otros autores que describen una subpoblación de células que no son pinealocitos y mantiene la expresión de VIM en la GP adulta [209, 229]. Nosotros hemos observado que esta población VIM<sup>+</sup> es muy abundante y heterogénea en cuanto a la expresión de varios de los marcadores analizados.



## En la glándula pineal adulta las células Pax6<sup>+</sup> expresan vimentina

Como fue descrito en el Capítulo anterior, el factor de transcripción Pax6 se expresa durante todo en desarrollo de la GP aunque sus niveles van disminuyendo a medida que avanza la maduración del órgano. En la GP adulta aún permanecen numerosas células que mantienen la expresión de Pax6. Los núcleos de estas células visualizados con DAPI o IP no poseen las características típicas de los de pinealocitos, este rasgo junto a su ubicación fuera de los folículos pinealocíticos las definen como intersticiales (FIG. 24). De hecho una gran parte de las células con núcleos típicos de las intersticiales pertenecen a poblaciones que expresan Pax6 y además son VIM<sup>+</sup> (FIG. 24), lo cual podría tener relación con un potencial rol de células progenitoras o precursoras, ya que en la GP embrionaria todas las células son Pax6<sup>+</sup>/VIM<sup>+</sup>.



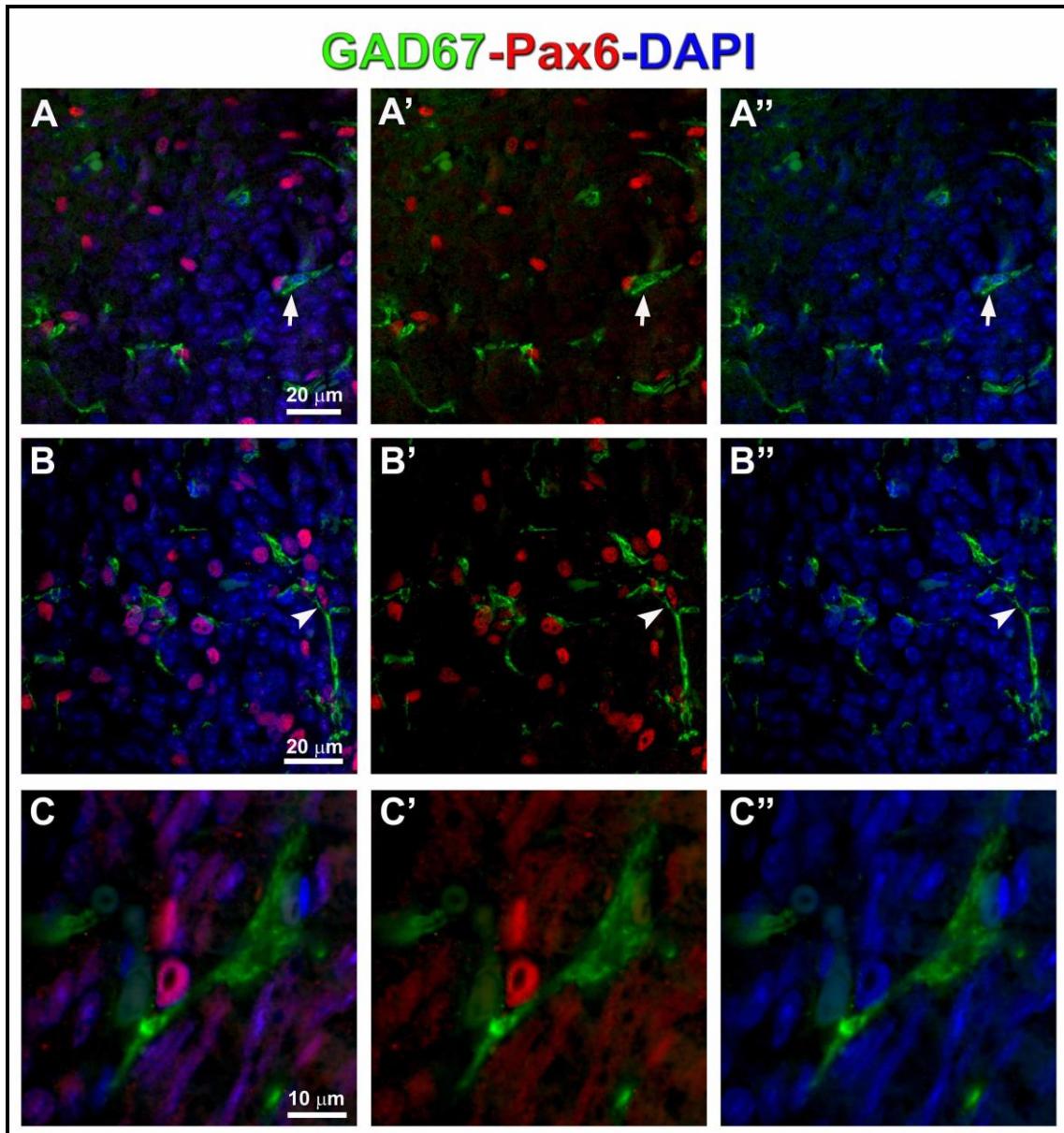
**FIG. 24: Células Pax6<sup>+</sup>/VIM<sup>+</sup> en la GP adulta.**

A-B') Doble IHQ para Pax6 (rojo) y VIM (verde). Núcleos marcados con DAPI (azul). Las flechas blancas marcan algunas de las numerosas células Pax6<sup>+</sup>/VIM<sup>+</sup>. Las flechas naranjas señalan células Pax6<sup>+</sup>/VIM<sup>+</sup> y la flecha amarilla indica a una célula Pax6<sup>+</sup>/VIM<sup>-</sup>, las menos abundantes. Microscopía confocal. A-A') 60X. B-B') 60X más zoom de 1.5X.

## La población Pax6 positiva no es GABAérgica

Para determinar si esta población Pax6<sup>+</sup> es GABAérgica, realizamos la doble marcación de GAD67 con Pax6 (FIG. 25). En las imágenes pudimos determinar que las

células que contienen Pax6 en sus núcleos no tienen a la enzima en sus citoplasmas. Pero se puede apreciar que las células Pax6<sup>+</sup> se ubican muy próximas a las terminales y células GABAérgicas. En base a estos resultados descartamos que estas células pertenezcan a la subpoblación GABA<sup>+</sup>/VIM<sup>+</sup> descrita anteriormente.



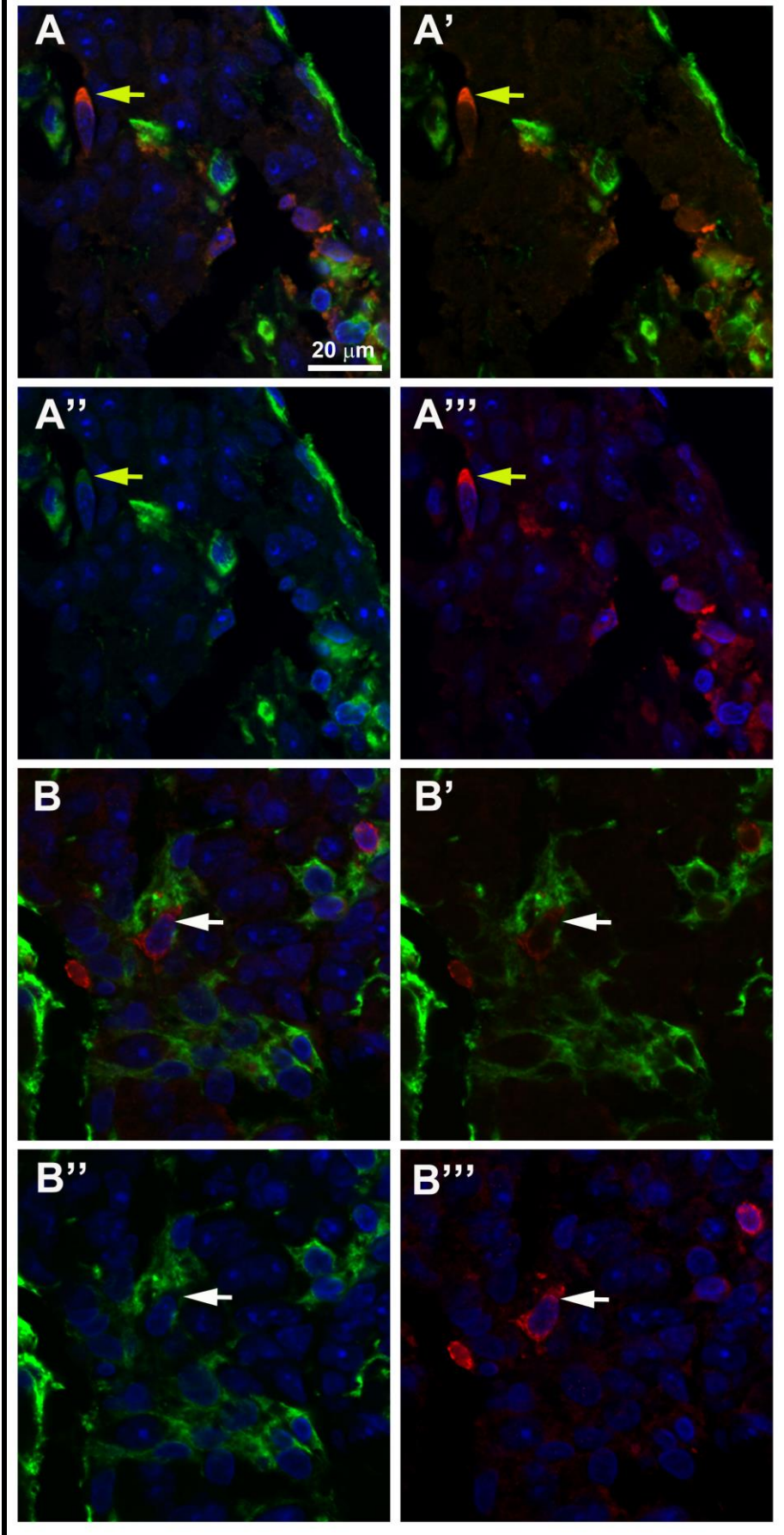
**FIG. 25: Las células Pax6 positiva son GAD67 negativas.**

A-C'') Doble IHQ para Pax6 (rojo) y GAD67 (verde). Núcleos marcados con DAPI (azul). Las células con núcleos Pax6 positivos no presentan GAD67 en sus citoplasmas. Se puede apreciar que las células Pax6<sup>+</sup> se asocian con fibras (cabeza de flecha blanca) y células GABAérgicas (flecha blanca). Microscopía confocal. A-A'') 60X, más zoom de 1,4X B-B'') 60X, más zoom de 1.5X. C-C'') 60X, más zoom de 2.5X.

## La microglía es parte de la población vimentina positiva de la glándula adulta.

Con el fin de avanzar en la caracterización de la población celular VIM positiva de la GP, buscamos relacionarla con el marcador de microglía Iba1 (del inglés *ionized calcium binding adaptor molecule 1*). Mediante IHQ doble, logramos detectar que una subpoblación de células microgliales, además de expresar el marcador específico Iba1, también contiene VIM (FIG. 27 A-A’’’). Este resultado confirma la heterogeneidad de la microglía, la cual puede estar reflejando un estado particular de activación. Wohl y cols. [230] describieron en retina la expresión de VIM en la microglía del tipo ramificada y no observaron un aumento de dicha proteína tras inducir activación por lesión del nervio óptico. Las células doblemente marcadas nos llevaron a preguntarnos si la subpoblación GABA<sup>+</sup>/VIM<sup>+</sup> podrían ser células microgliales.

VIM-Iba1-DAPI



**FIG. 27: Una subpoblación microglial es VIM positiva.**

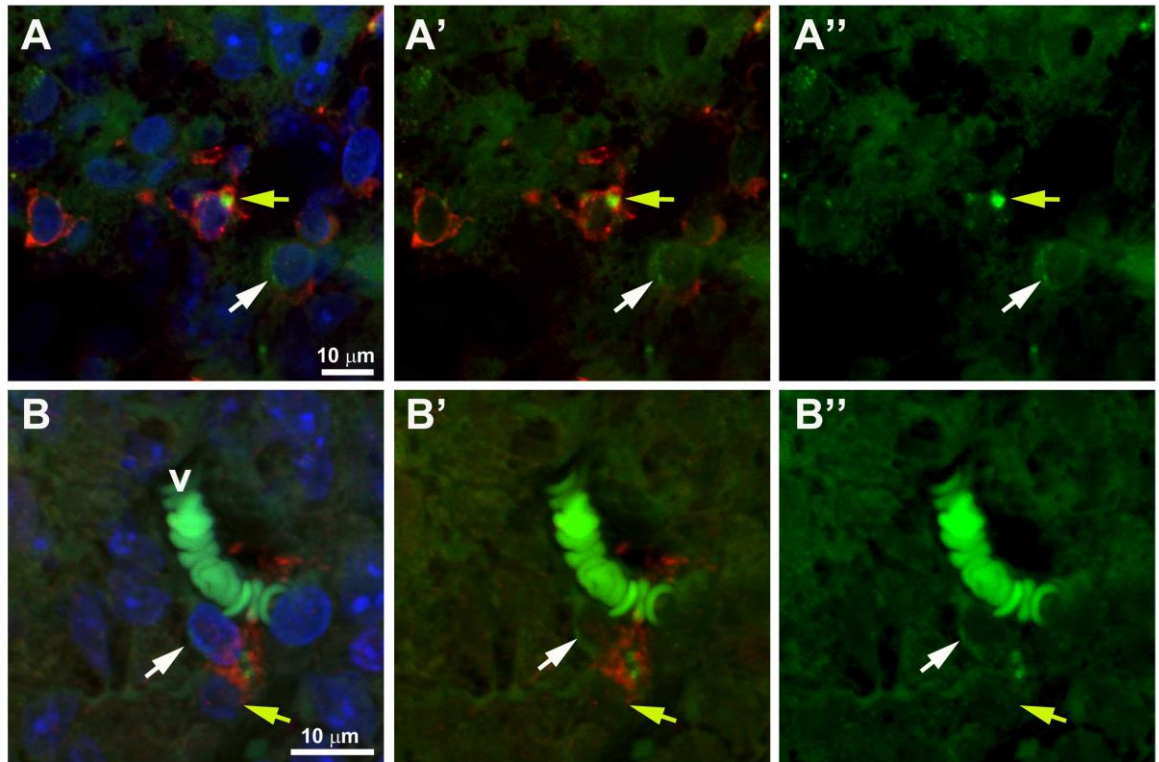
A-B''') IHQ doble para VIM (verde) e Iba1 (rojo). Núcleos marcados con DAPI (azul). A-A''') Microglía Iba1 positiva con expresión de VIM en su citoplasma (flecha amarilla). B-B''') Microglía Iba1<sup>+</sup> sin expresión de VIM (flecha blanca). Microscopía confocal. A-B''') 60x, más zoom de 2X.

La microglía estaría fagocitando fibras y/o células GABAérgicas

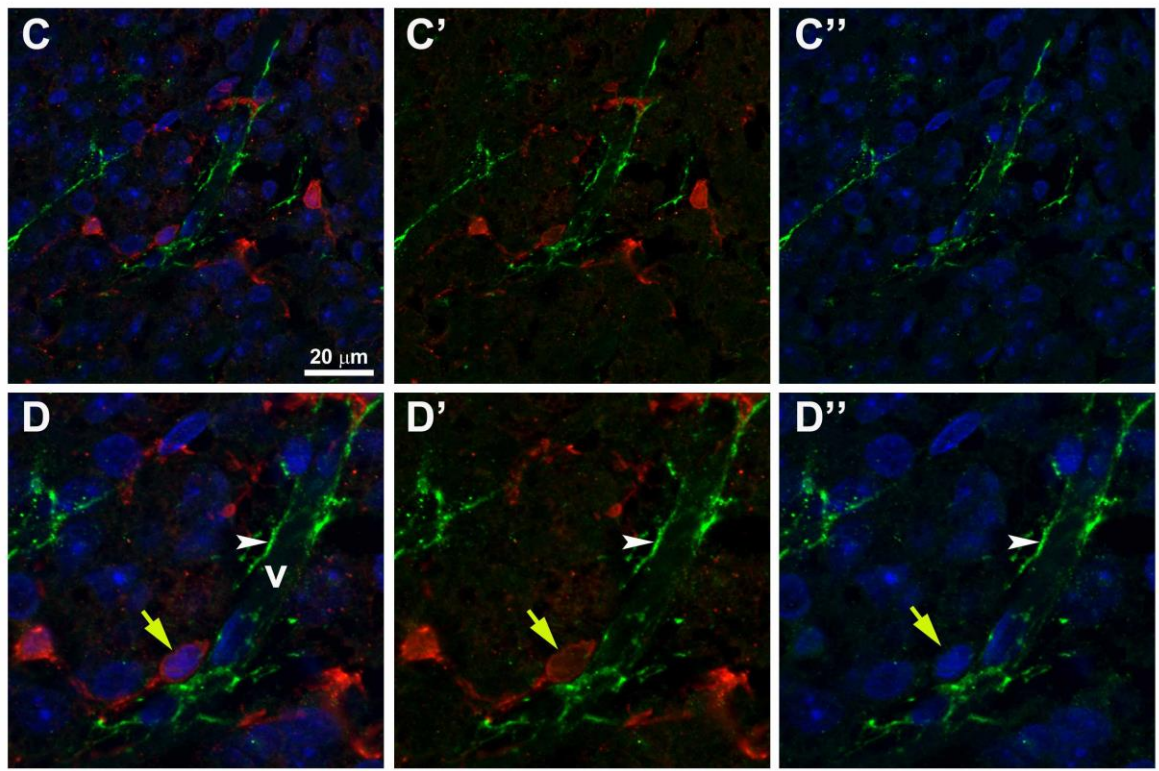
Se realizaron ensayos de doble IHQ para GABA/Iba1 con el fin de evaluar si la microglía tiene capacidad GABAérgica. Encontramos que algunas de las células Iba1 positivas presentaban marca para el transmisor GABA, pero en forma de grandes grumos pleomórficos en sus citoplasmas (FIG. 28 A-A''). Esta señal es distinta a la observada en la subpoblación de células intersticiales VIM positivas (FIGS. 21 y 28 A-A''). Debido a la actividad fagocítica de la microglía y las características de las inclusiones citoplasmáticas observadas, suponemos que podría tratarse de fagolisosomas ricos en detritos provenientes de fibras o células GABAérgicas. La proximidad espacial de células microgliales y células GABAérgicas propiamente dichas avalarían esa hipótesis (FIG. 28 B-B'').

Además observamos que células de la microglía Iba1<sup>+</sup> guardan una estrecha relación con fibras GABAérgicas GAD67<sup>+</sup>, pero no detectamos a la enzima en el citoplasma de las primeras (FIG. 28 C-D''). Actualmente en nuestro laboratorio está siendo estudiada la dinámica de los mecanismos de fagocitosis de células, fibras y vasos por parte de la microglía a lo largo del desarrollo. Datos en proceso de publicación de la doctoranda Ibáñez evidencian que la microglía de la GP está involucrada en la remodelación de terminales nerviosos y vasos, y con mayor afinidad de células relativamente indiferenciadas o precursores Pax6<sup>+</sup>.

### GABA-Iba1-DAPI



### GAD67-Iba1-DAPI



**FIG. 28: Relación de la microglía con células y fibras GABAérgicas.**

A-B'') IHQ doble para GABA (verde) e Iba1 (rojo). Núcleos marcados con DAPI (azul). A-A'') Presencia de GABA en microglía Iba1 positiva como grandes grumos citoplasmáticos (flecha amarilla) y en células intersticiales Iba1 negativas como un fino puntillado (flecha blanca). B-B'') Microglía Iba1<sup>+</sup> (flecha amarilla) en estrecho contacto con una célula GABAérgica (flecha blanca) en la vecindad de un vaso (V). C-D'') IHQ doble para GAD67 (verde) e Iba1 (rojo). Núcleos marcados con DAPI (azul). La microglía (flecha amarilla) se ubica muy próxima a las fibras GABAérgicas (cabeza de flecha). Microscopía confocal. A-A''' y D-D''') 60X, más zoom de 3X. B-B''') 60x, más zoom de 3.5X. C-C''') 60x, más zoom de 1.5X.

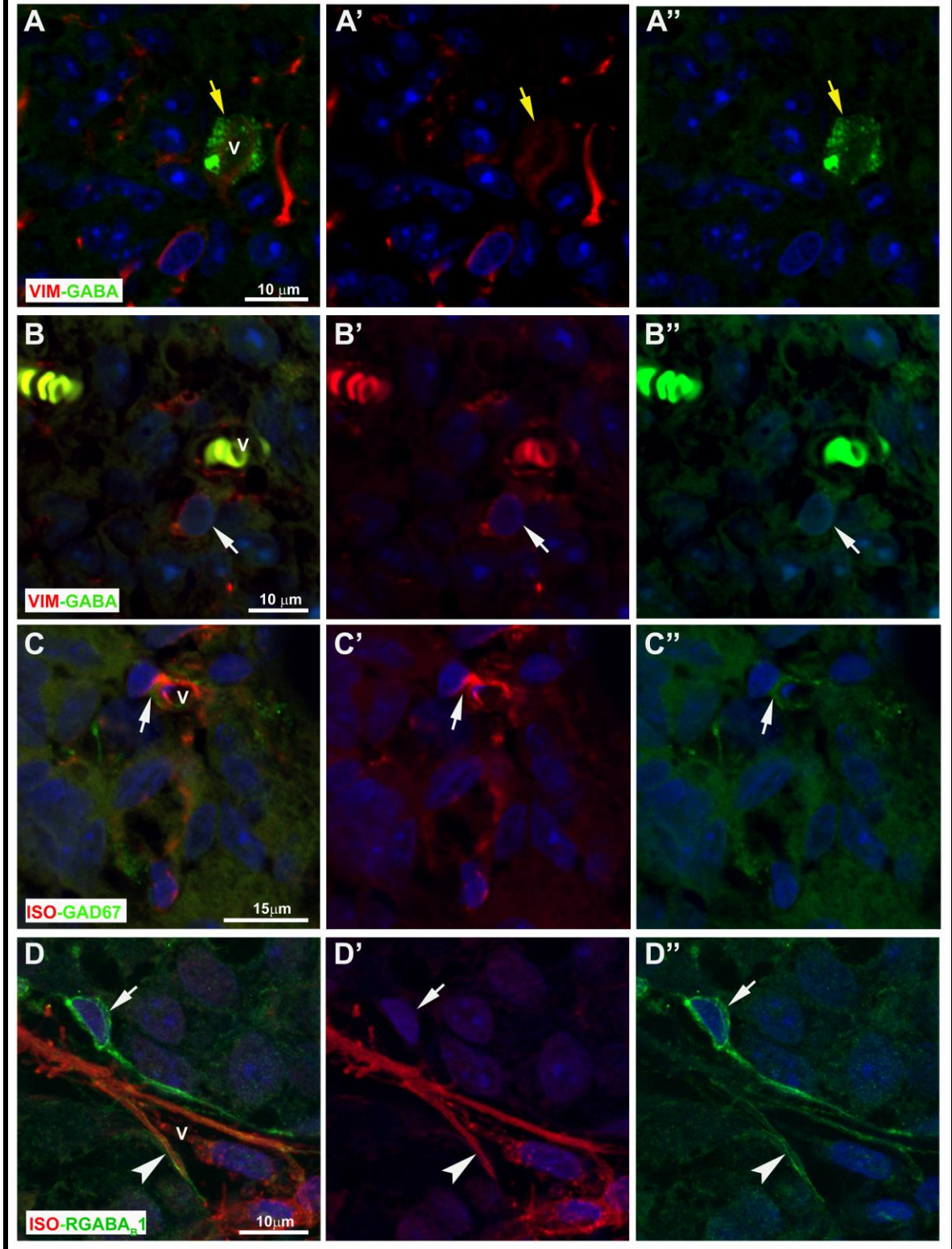
De todos los datos presentados hasta el momento podemos decir que las células GABAérgicas propiamente dichas de la GP adulta de rata están representadas por una pequeña subpoblación perivascular de células intersticiales VIM<sup>+</sup>, Iba1<sup>-</sup> y Pax6<sup>-</sup>.

**Las células GABAérgicas también podrían estar involucradas con la regulación de la fisiología de los vasos sanguíneos**

Un punto importante a tener en cuenta es que la distribución espacial de los componentes del sistema GABAérgico parece estar relacionada a la microvasculatura glandular. El anticuerpo anti-VIM, además de las poblaciones de células intersticiales mencionadas anteriormente, marca las paredes de los vasos; por lo que junto a la isolectina (ISO) la hemos utilizamos como indicador vascular. Mediante ensayos de co-localización se observó abundante señal de GABA en estructuras vasculares VIM<sup>+</sup> (FIG. 29 A-A''). También hemos observado tanto a la enzima GAD67 como al GABA en células estrechamente relacionadas a vasos sanguíneos (FIG. 29 B-C''). Estas células rodean los vasos sanguíneos con sus prolongaciones generando claramente una amplia superficie de contacto entre ellas y los vasos. A esto sumamos que pudimos localizar al RGABA<sub>B1</sub> en las membranas de células de las paredes de los vasos (FIG. 29 D-D''). Esto sugiere que la fisiología de los vasos sanguíneos podría ser influenciada por el GABA que liberan estas células perivasculares.



### Marcadores GABAérgicos y Vasos-DAPI



**FIG. 29: Marcadores GABAérgicos y su relación con vasos sanguíneos.**

A-A'') Depósito de GABA (verde; flecha amarilla) en un vaso sanguíneo (V) identificado con el marcador vascular VIM (rojo). B-B'') En el canal verde se observa GABA en una célula intersticial (flecha blanca) estrechamente asociada a un vaso en el cual se pueden apreciar glóbulos rojos. En rojo se ve la VIM que sigue el contorno del vaso y además marca a la célula GABAérgica. C-C'') Célula intersticial GAD67 positiva en estrecho contacto con un vaso sanguíneo marcado con isolectina (ISO, rojo, flecha blanca). Note que las señales no co-localizan a pesar de su proximidad. D-D'') Expresión del RGABA<sub>B1</sub> (verde) en una célula perivascular (flecha blanca) y en la pared de un vaso sanguíneo marcado con ISO (rojo). Observe la fina línea que revela la localización del RGABA<sub>B1</sub> en la membrana celular que forma la pared del vaso (cabeza de flecha blanca). Microscopía confocal. A-B'') 60X, más zoom de 2.7X. C-C'') 60X, más zoom de 2.5X. D-D'') 100X, más zoom de 2X.

## Receptores GABA en la glándula pineal adulta

Nos pareció de suma importancia definir qué poblaciones son las que potencialmente podrían responder al GABA en la GP adulta, aspecto que ha sido pobremente abordado en la bibliografía. Ensayos farmacológicos *in vitro* utilizando drogas que afectan a los receptores GABA han sugerido la existencia de los mismos en la GP y una probable modulación del ritmo de melatonina. La IHQ es la mejor herramienta con la que contamos para cumplir este objetivo, ya que nos permite localizar el lugar preciso donde se ubica cada una de nuestras moléculas de interés en el tejido glandular.

### RGABA<sub>B1</sub> se localiza en las células perivasculares Pax6 positivas

En la GP adulta, la subunidad B1 del receptor GABA metabotrópico además de localizarse en vasos sanguíneos como se menciona en el párrafo anterior, está presente en los somas y proyecciones de una subpoblación de células intersticiales. La morfología general de estas células es distinta a la de los pinealocitos; presentan núcleos más pequeños y densos, así como extensas y finas prolongaciones con las que ocasiones contactan entre ellas y con vasos (FIG. 30). Estas células al igual que en los estadios neonatales, resultaron

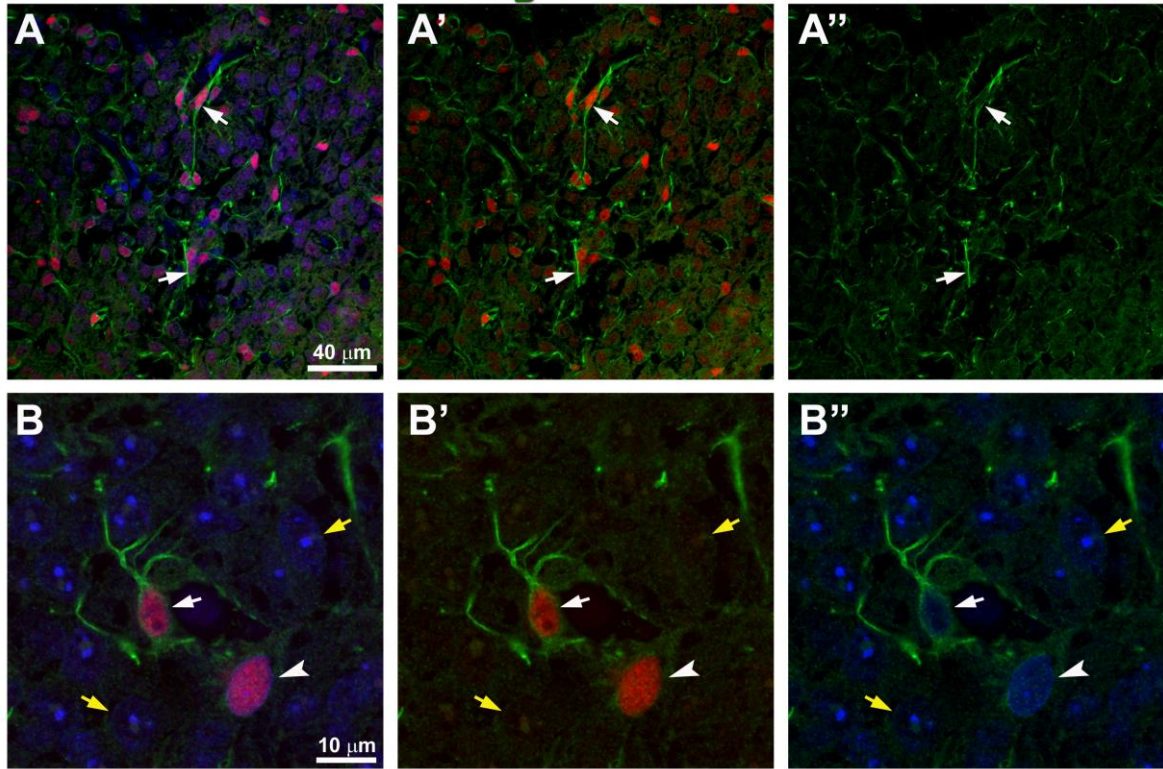
ser Pax6 positivas, aunque en la adultez se encuentran en menor proporción (FIG. 30 A-B''). Un aspecto interesante que observamos es que los niveles del receptor varían de una célula a otra al igual que Pax6. En la FIG. 30 B-B'' se muestran dos células que presentan diferencias a nivel de la subunidad B1 del receptor pero no con respecto a Pax6. En la imagen B'' se puede relacionar la morfología nuclear con la localización del receptor: la célula con fuerte expresión del RGABA<sub>B</sub>1 inclusive en las proyecciones, posee un núcleo pequeño, denso y sin nucléolos visibles, mientras que la otra donde el receptor es más difuso, el núcleo es de mayor tamaño y laxo. Cabe aclarar que la mayoría de las células Pax6 son como la descrita en primer lugar, sólo unas pocas muestran las características de la segunda. No obstante, la morfología nuclear de ambos tipos celulares es distinta a la de los pinealocitos que las rodean.

La localización de las células Pax6<sup>+</sup>/RGABA<sub>B</sub>1<sup>+</sup> es principalmente perivascular y suelen desplegar sus prolongaciones en la misma orientación de los vasos. En la FIG. 30 C-C'' se muestra la estrecha relación que mantienen las células RGABA<sub>B</sub>1<sup>+</sup> con vasos sanguíneos visualizados con ISO. Con el fin de evaluar la ubicación en membrana de la subunidad B1 del receptor, se realizó una doble IHQ de la misma junto con la proteína G0 (G0). Esta proteína es muy abundante y se asocia al lado interno de las membranas celulares, y como resultado de su marcación, se logra visualizar todo el conjunto de membranas de las células de la GP. Mediante esta tinción pudimos definir que la señal del receptor acompaña a las membranas de precursores (FIG. 30 D-D'') y por ende, es de suponer que resultan funcionales.

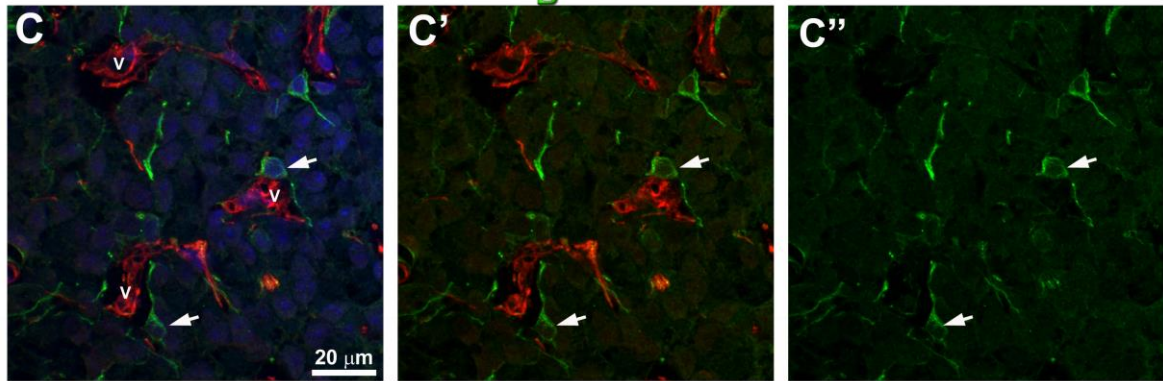
Los datos que mostramos en esta sección nos llevaron a hipotetizar que la población de células Pax6<sup>+</sup>/RGABA<sub>B</sub>1<sup>+</sup> de la GP adulta, podría representar una reserva de precursores que se mantienen latentes/quiescentes y eventualmente podrían diferenciarse en pinealocitos. Un dato que cobra relevancia es su relación con vasos sanguíneos, pudiendo resultar un potencial "nicho vascular" de células progenitoras que encuentran un ambiente trófico favorable dentro de un tejido adulto [231, 232]. Por otro lado, como hemos mencionado anteriormente, las células Pax6<sup>+</sup> en la GP adulta mantienen estrecha relación con terminales y células GABAérgicas, las cuales podrían estar generando un ambiente rico en GABA (FIG. 25). Además, las variaciones en la abundancia y localización del RGABA<sub>B</sub>1, la expresión de Pax6 y la morfología nuclear, podrían reflejar distintos grados de diferenciación de estos precursores, como sucede durante el desarrollo

del cerebelo (ver Capítulo I, FIG. 17). Esta hipótesis le otorga al GABA un rol central en el proceso de diferenciación de células precursoras en el contexto de un órgano maduro.

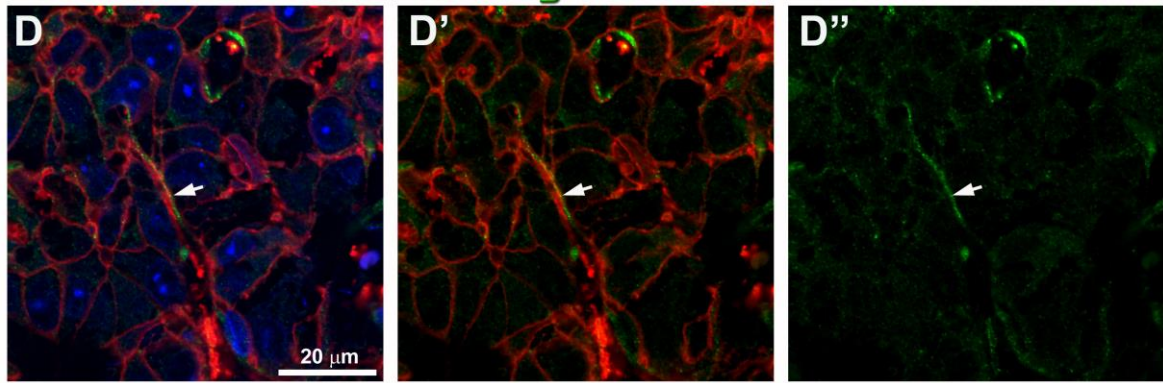
### RGABA<sub>B</sub>1-Pax6-DAPI



### RGABA<sub>B</sub>1-ISO-DAPI



### RGABA<sub>B</sub>1-GO-DAPI

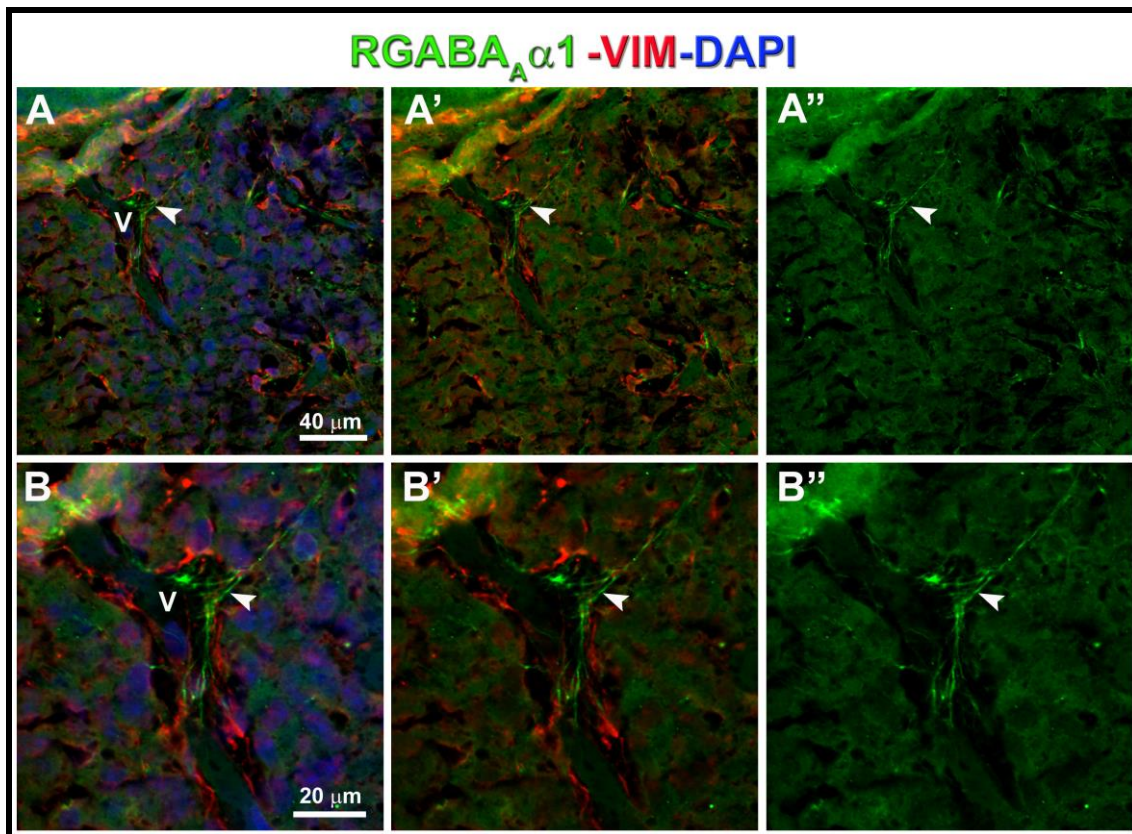


**FIG. 30: Localización de los RGABA<sub>B</sub>1 en células Pax6<sup>+</sup> en GP adulta.**

A-B'') IHQ doble para RGABA<sub>B</sub>1 (verde) y Pax6 (rojo). Núcleos marcados con DAPI (azul). A-A'') Se puede detectar la subunidad B1 del receptor en la mayoría de las células Pax6<sup>+</sup> del campo (flechas blancas). B-B'') A mayor aumento podemos ver variaciones en la morfología nuclear y la localización del receptor en estas células. Se observan células con fuerte expresión de RGABA<sub>B</sub>1, con largas proyecciones y núcleos pequeños, densos y sin nucléolos visibles (flecha blanca), y otras donde el receptor es más difuso y los núcleos son de mayor tamaño y laxos (cabeza de flecha blanca). Los pinealocitos sin marca para RGABA<sub>B</sub>1 poseen núcleos laxos y con prominentes nucléolos (flechas amarillas). C-C'') IHQ para RGABA<sub>B</sub>1 (verde) y tinción con ISO (rojo). Se puede apreciar la estrecha relación entre las células positivas para el receptor y los vasos sanguíneos. D-D'') Doble IHQ para RGABA<sub>B</sub>1 (verde) y G0 (rojo). G0 marca los contornos de las membranas celulares, de manera que permite definir la localización del receptor en ellas (flecha blanca). Microscopía confocal. A-A'') 60X. B-B'') 100X, más zoom de 2.5X. C-C'') 60X, más zoom de 2X. D-D'') 100X, más zoom de 1.8X.

**La subunidad RGABA<sub>A</sub>α1 se ubica principalmente a nivel de fibras nerviosas**

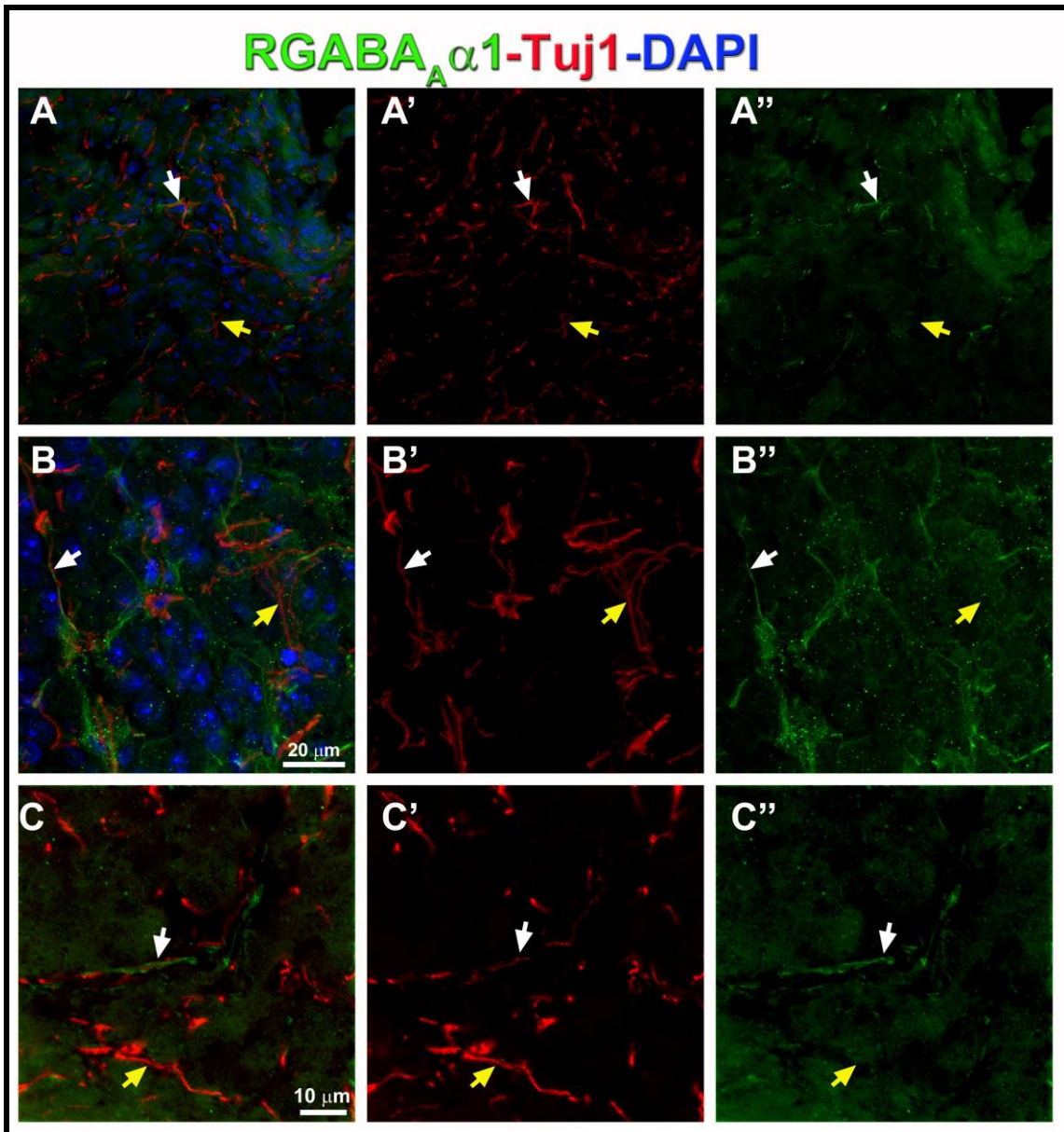
Localizamos a la subunidad α1 del receptor ionotrópico para GABA asociado a finas prolongaciones con aspecto de fibras nerviosas que acompañan el trayecto de los vasos sanguíneos VIM<sup>+</sup> (FIG. 31). A diferencia de las imágenes obtenidas para la RGABA<sub>B</sub>1, las proyecciones aquí descritas son mucho más finas y no están asociadas a células. Para poder definir si la subunidad α1 se localiza efectivamente en fibras nerviosas se realizaron ensayos con diferente marcadores, incluido el marcador promiscuo Tuj1.



**FIG. 31: RGABA<sub>A</sub>α1 se localizan en finas proyecciones que se relacionan con vasos sanguíneos.**

A-B'') IHQ doble para RGABA<sub>A</sub>α1 (verde) y VIM (rojo). Núcleos marcados con DAPI (azul). Claramente se pueden observar proyecciones finas (cabeza de flecha) marcadas con el receptor, que se asocian a un vaso sanguíneo (V) VIM<sup>+</sup>. Microscopía confocal. A-A'') 60X. B-B'') 60X, más zoom de 2X.

La doble inmunomarcación RGABA<sub>A</sub>α1 y Tuj1 mostró que si bien hay relación entre ambas moléculas la correlación fue parcial (FIG. 32). No observamos co-localización, resultado esperado ya que la tubulina III β es un componente del citoesqueleto y el receptor -de ser funcional- se ubicaría principalmente a nivel de las membranas plasmáticas. Las imágenes a mayor aumento de la FIG. 32 C-C'' permiten apreciar la marca de Tuj1 en el interior de una fibra nerviosa y la del receptor en la parte externa (se tomaron imágenes de múltiples planos focales y se realizaron reconstrucciones en el eje Z para analizar este punto).



**FIG. 32: RGABA<sub>A</sub>α1 se localiza en algunas de fibras nerviosas que inervan la GP.**

A-C'') IHQ doble para RGABA<sub>A</sub>α1 (verde) y Tuj1 (rojo). Núcleos marcados con DAPI (azul). Las fibras Tuj1<sup>+</sup> se localizan en las mismas regiones que las proyecciones RGABA<sub>A</sub>α1<sup>+</sup> pero no se corresponden en toda su extensión. Se observan fibras Tuj1<sup>+</sup> con (flechas blanca) y sin (flechas amarillas) el receptor. C-C'') En las imágenes a mayor magnificación se puede apreciar la estrecha relación entre las marcas en tramos definidos. Microscopía confocal. A-A) 60X. B-B'') 60x, más zoom de 2X. C-C'') 60x, más zoom de 3X.



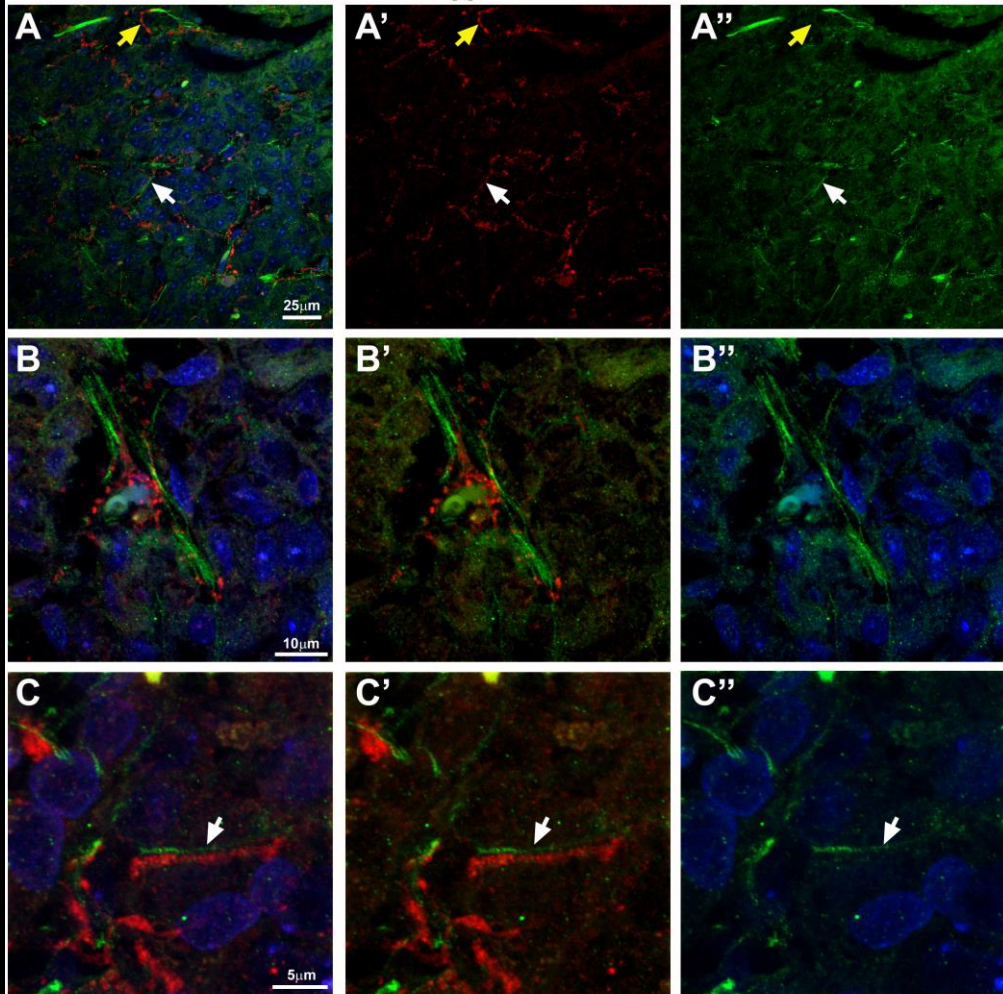
## RGABA<sub>A</sub>α1 se asocia principalmente con fibras nerviosas simpáticas

Con el fin de identificar el o los tipos de inervaciones que se asociarían con RGABA<sub>A</sub>α1 se evaluó la relación de dicha subunidad con fibras simpáticas mediante la detección de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y fibras GABAérgica GAD67<sup>+</sup>. Al igual que la tubulina III β, tanto TH como GAD67 se encuentran en el interior de las fibras nerviosas, por lo que no se debe esperar una colocación exacta con el receptor. Una diferencia importante entre la marcación de Tuj1 y las enzimas mencionadas es que la distribución de estas últimas puede no ser tan homogénea y lineal como la de la primera, esto le da a las fibras un aspecto más entrecortado y globular (FIG. 33).

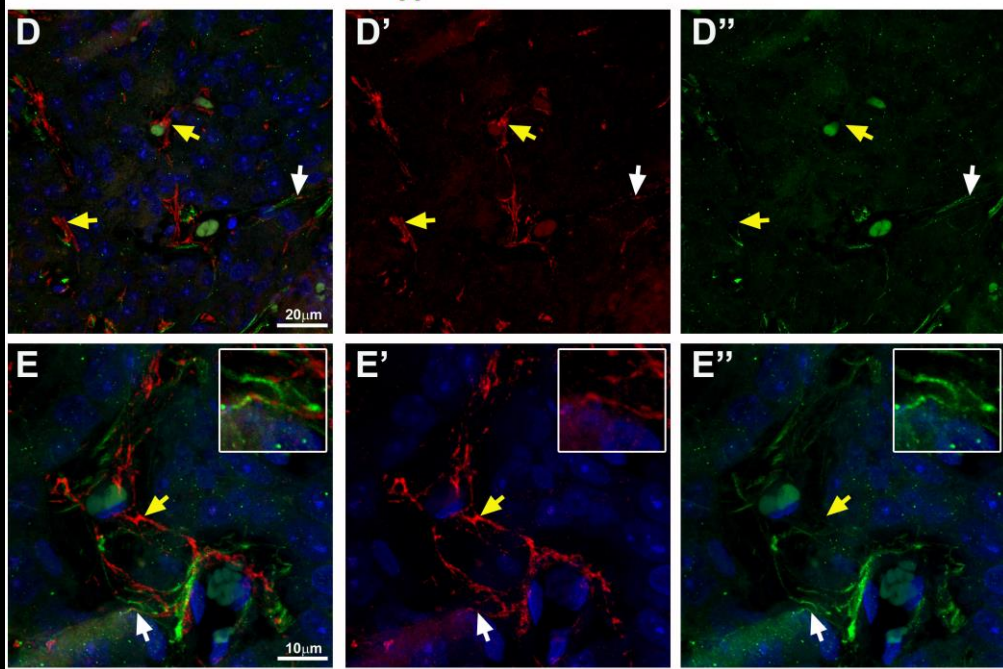
Se observó que RGABA<sub>A</sub>α1 se localiza tanto en fibras simpáticas como GABAérgicas aunque la correlación fue parcial al igual que en el caso de Tuj1. La señal del receptor fue más abundante en las fibras TH<sup>+</sup> que en las GAD67<sup>+</sup>. En la FIG. 33 se pueden comparar las imágenes a bajo aumento de A-A'' (TH) con D-D'' (GAD67), las cuales permiten apreciar la correlación parcial entre la marca roja (fibras) y la verde (receptor). En las imágenes a mayor aumento (FIG. 33 B-B'', C-C'' y E-E'' e *inset*) se indican tramos de estrecha relación entre las señales verde y roja.

En resumen, del análisis de tan solo dos subunidades de la recepción GABA en la GP podemos afirmar e hipotetizar que: 1) A partir de estadios postnatales RGABA<sub>B</sub>1 se localizaría en potenciales células progenitoras Pax6<sup>+</sup> y en vasos sanguíneos. 2) La RGABA<sub>A</sub>α1 se ubicaría de manera discontinua en fibras nerviosas simpáticas y GABAérgica, siendo más abundantes en las primeras. 3) La localización de ambas subunidades en el nicho vascular y perivascular las hace susceptibles de ser activadas por el GABA circulante y local, este último proveniente de fibras y células GABAérgicas descritas en esta sección. Funciones de modulación del estado quiescente de precursores celulares y actividades pre-sinápticas son algunos de los roles que estos ensayos de IHQ sugerirían.

**RGABA<sub>A</sub> $\alpha$ 1-TH-DAPI**



**RGABA<sub>A</sub> $\alpha$ 1-GAD67-DAPI**



**FIG. 33: RGABA<sub>A</sub>α1 se localiza en tramos de fibras nerviosas simpáticas y GABAérgicas en la GP adulta.**

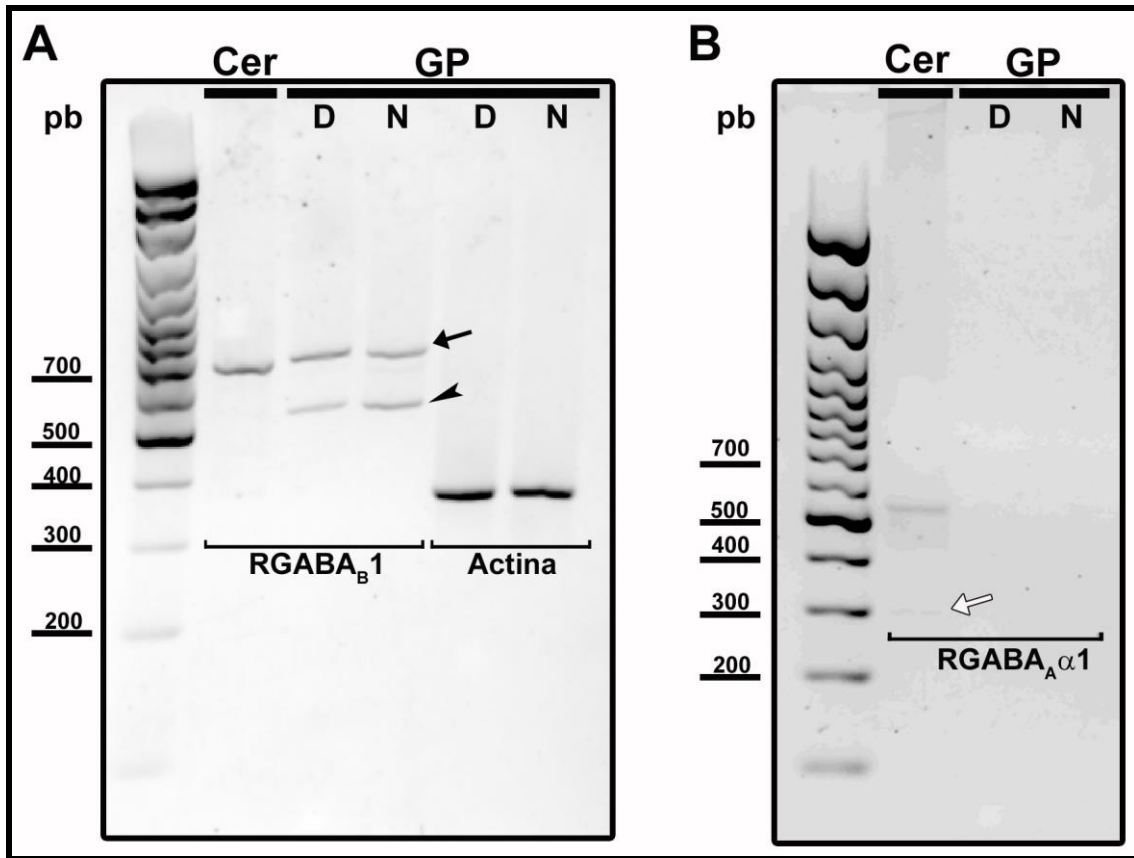
A-C'') IHQ doble para RGABA<sub>A</sub>α1 (verde) y TH (rojo). Núcleos marcados con DAPI (azul). Las fibras TH<sup>+</sup> se localizan en las mismas regiones que las proyecciones RGABA<sub>A</sub>α1<sup>+</sup> pero se corresponden de manera parcial. Se observan fibras TH<sup>+</sup> con (flechas blanca) y sin (flechas amarillas) el receptor C-C'') En las imágenes a mayor magnificación se puede apreciar la estrecha relación entre las marcas. D-E'') IHQ doble para RGABA<sub>A</sub>α1 (verde) y GAD67 (rojo). D-D'') Se puede apreciar que una gran proporción de las fibras no se correlacionan con el receptor (flechas amarillas). E-E'') A mayor aumento se visualizan algunos tramos de la innervación GABAérgica que sí parecen tener señal para el receptor (flechas blancas e *inset*). Microscopía confocal. A-A'') 60X. B-B'') y E-E'') 100X, más zoom de 2X. C-C'') 100X, más zoom de 4X. E-E'') 100X, más zoom de 1.9X. D-D'') 60X, más zoom 1.2X.

## Análisis por RT-PCR de los mensajeros de las subunidades de RGABA metabotrópico e ionotrópico

Se realizaron ensayos de RT-PCR en GP y cerebelo con el fin de detectar la presencia de los ARNm de las subunidades estudiadas. Se logró hallar al mensajero de la RGABA<sub>B</sub>1 en muestras de cerebelo y GP (FIG. 34 A), en este último órgano los niveles en muestras colectadas a ZT6 (mitad de la fase de luz) y ZT18 (mitad de la fase de oscuridad) resultaron similares. Estos resultados están de acuerdo con los ensayos inmunohistoquímicos, debido a que las células RGABA<sub>B</sub>1<sup>+</sup> estuvieron presentes en todos los ZT analizados. Un dato interesante es que en cerebelo se amplificó solo el fragmento específico de ~675 pb mientras que en GP se amplificaron dos fragmentos el de ~675 pb y otro de ~580 pb, lo que podría indicar algún tipo de regulación alternativa de dicho mensajero en la pineal.

Por otro lado, RGABA<sub>A</sub>α1 sólo pudo ser detectada en cerebelo (FIG. 34 B). Este resultado también estaría de acuerdo con los datos inmunohistoquímicos, ya que a dicha subunidad la localizamos en fibras nerviosas que llegan a la GP que pertenecen a neuronas que se encuentran fuera de la glándula. RGABA<sub>A</sub>α1 no fue observada en ninguno de los tipos celulares que conforman la GP. Por lo tanto, la síntesis de RGABA<sub>A</sub>α1 se produciría

en somas neuronales extrapineales y sería transportado a las fibras nerviosas, donde el anticuerpo pudo detectarlo.



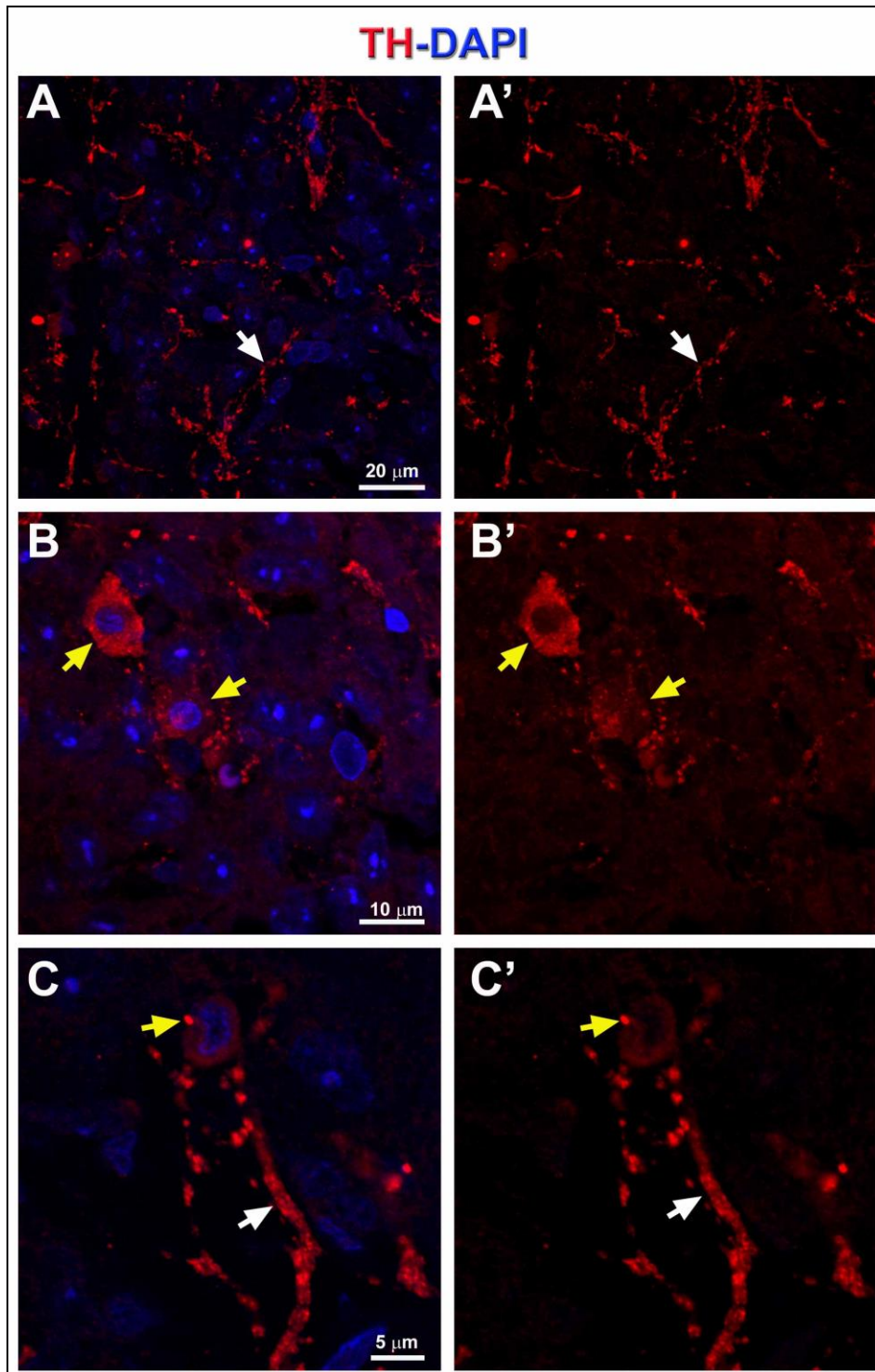
**FIG. 34: Presencia del mensajero de la subunidad RGABA<sub>B</sub>1 pero no de la RGABA<sub>A</sub>α1 en GP adulta.**

A-B) RT-PCR. A) Mensajero de la RGABA<sub>B</sub>1 en cerebelo (Cer) y GP en el día (D) y la noche (N). El fragmento específico de ~675 pb se observa en ambos órganos y aparentemente no presenta variaciones en el nivel de expresión entre los ZTs analizados (flecha negra). En GP aparece una segunda banda de ~580 pb (cabeza de flecha). Note que las bandas de la actina (control de carga) son similares en los dos ZTs. B) Mensajero de la RGABA<sub>A</sub>α1 en Cer pero no en GP (fragmento de ~320 pb flecha blanca). En ambas corridas se utilizó un marcador con fragmentos de longitudes conocidas.

## Presencia de células TH<sup>+</sup> en la glándula pineal

La detección de la enzima TH ha sido utilizada para evidenciar la inervación simpática en la GP [233, 234]. Esta herramienta nos fue muy útil ya que nos permitió individualizar las fibras simpáticas y compararlas con las GABAérgicas. Sin embargo, además de las fibras (FIG. 35 A-A'), el anticuerpo anti-TH detectó a células dispersas en la

GP (FIG. 35 B-C'). Estas células son bastante escasas y presentan una morfología distinta a los pinealocitos y células intersticiales presentadas en este trabajo de Tesis. Pensamos que podría tratarse de neuronas catecolaminérgicas propias de la GP. La existencia de neuronas en la GP de roedores ha sido un tema controversial. Si bien varios trabajos hacen referencia a las mismas, su naturaleza química es desconocida [22]. Por lo tanto, sería importante ahondar en el estudio de estas células ya que podrían representar una fuente de NA local y como sabemos, este neurotransmisor tiene una función esencial en la regulación del ritmo de melatonina.



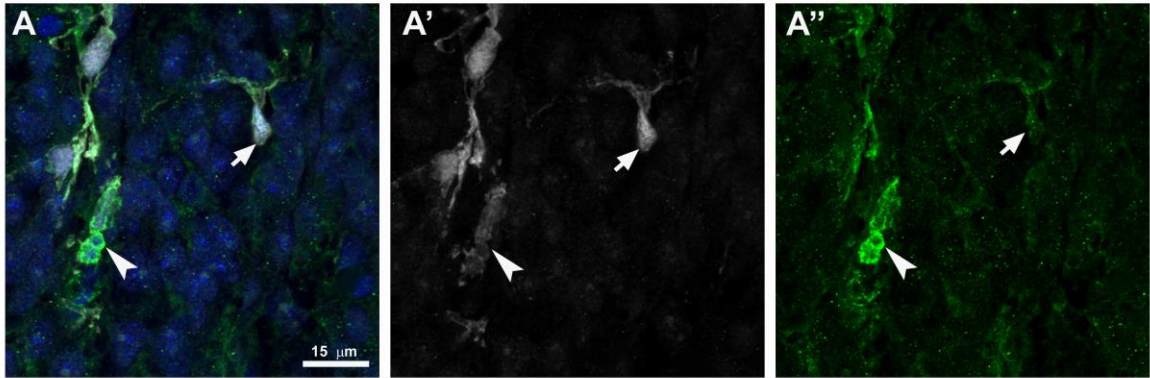
**FIG. 35: TH en la GP**

A-C') IHQ para TH (rojo). Núcleos marcados con DAPI (azul). A-A') Las fibras TH<sup>+</sup> se distribuyen en todo el parénquima glandular (flecha blanca). B-C') Imágenes a mayor magnificación con células TH<sup>+</sup> (flechas amarillas). Se puede apreciar que las células tienen abundante citoplasma con grandes grumos ricos en la enzima y núcleos con cromatina densa y ausencia de nucléolos. Microscopía confocal. A-A) 100X. B-B') 100X, más zoom 2X. C') 100X, más zoom de 3X.

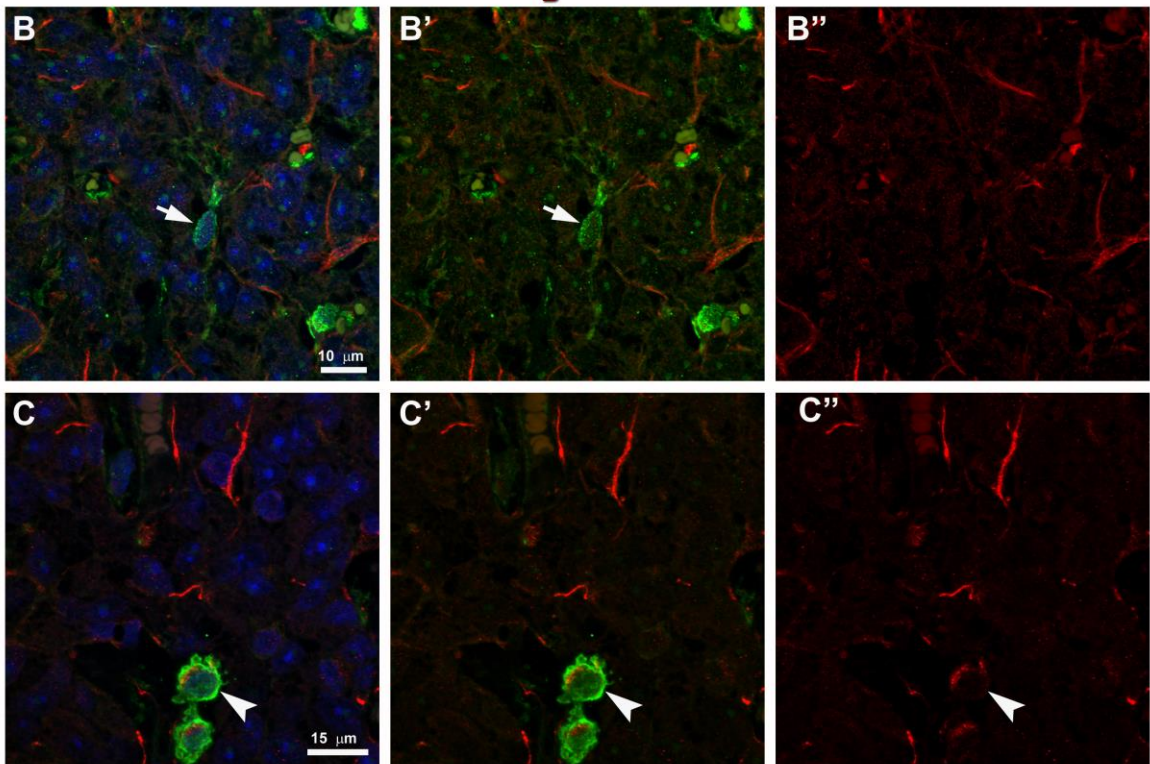
## La microglía presenta un patrón de actina característico

En nuestra búsqueda de caracterizar mejor a la población de células intersticiales de la GP, realizamos ensayos de inmunomarcación de actina y encontramos que nos permite diferenciar una subpoblación de células intersticiales frecuentemente asociada a los vasos sanguíneos. Por su ubicación y morfología pensamos que podría tratarse de células microgliales, lo cual comprobamos mediante una doble marcación con Iba1 (FIG. 36 A-A''). La dinámica del citoesqueleto de actina juega un rol importante en la motilidad y la actividad fagocítica de estas células [235]. El patrón de actina podría ser un buen marcador de la activación microglial, ya que se ha visto que factores activadores producen un aumento de la expresión y reorganización tanto de  $\alpha$ -actina como  $\beta$ -actina [236]. Si bien actina forma parte del citoesqueleto de toda célula, nosotros pudimos observar que su inmunomarcación permite diferenciar subtipos celulares; en GP las más intensas son las que poseen morfología de microglía activada, con forma ameboide y con grandes inclusiones citoplasmáticas (FIG. 36 A-A''). Por otro lado, analizamos la localización de las RGABA<sub>B</sub>1 en relación a estas células ricas en actina. En general dichas células no parecen expresar el receptor en su superficie, aunque algunas presentaron marca en forma de grumos citoplasmáticos (FIG. 36 B-C''). Es posible que al igual que el caso de la marca de GABA en las células Iba1 positivas (FIG. 28 A-A''), también se trate de fagolisosomas RGABA<sub>B</sub>1<sup>+</sup> en el citoplasma de la microglía. Ese material podría representar restos de vasos sanguíneos o de células Pax6<sup>+</sup>, que como dijimos anteriormente, poseen el receptor. De hecho pudimos observar cierta interacción entre las células Pax6<sup>+</sup>/RGABA<sub>B</sub>1<sup>+</sup> y la microglía (FIG. 36 D-D'').

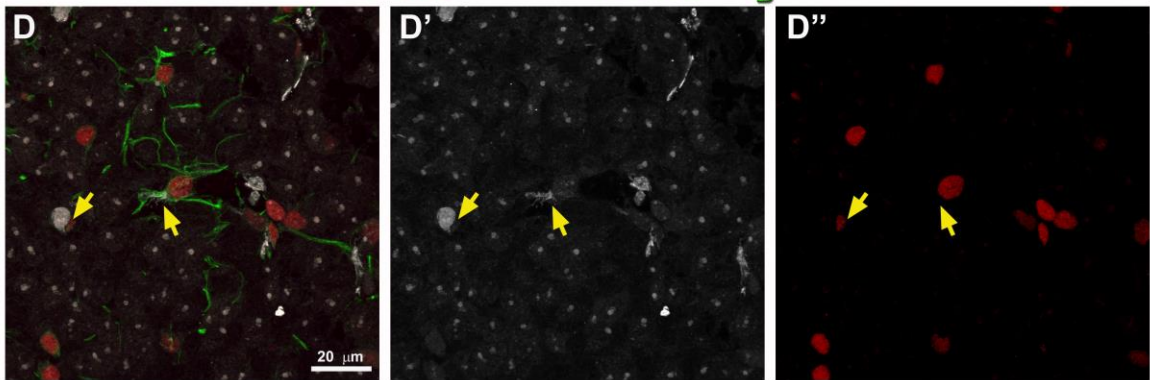
Iba1-Act-DAPI



RGABA<sub>B</sub>1-Act-DAPI



Pax6-Iba1-RGABA<sub>B</sub>1





### **FIG. 36: Patrón característicos de actina en la microglía pineal**

A-A'') Doble IHQ para actina (verde) e Iba1 (gris). Núcleos marcados con DAPI (azul). La microglía Iba1<sup>+</sup> con forma ameboide (cabeza de flecha blanca) son más ricas en actina que las que se presentan más ramificadas (flecha blanca). B-C'') Doble IHQ para actina (verde) y RGABA<sub>B</sub>1 (rojo). Núcleos marcados con DAPI (azul). En general las células que expresan fuertemente actina, no presentan el receptor en su superficie (flecha blanca). En algunos casos se observó a la subunidad en forma de grumos citoplasmáticos (cabeza de flecha). D-D''). Triple IHQ para Pax6 (rojo), Iba1 (gris) y RGABA<sub>B</sub>1 (verde). Se puede apreciar la estrecha relación entre la microglía y las células Pax6<sup>+</sup>/RGABA<sub>B</sub>1<sup>+</sup> (flechas amarillas). Microscopía confocal. A-A'') 100X, más zoom de 2.4X. B-B'') 100X, más zoom de 1.6X. C-C'') 100X, más zoom de 2X. D-D'') 100X, más zoom de 1X.

## **Sistema Glutamatérgico en la glándula pineal**

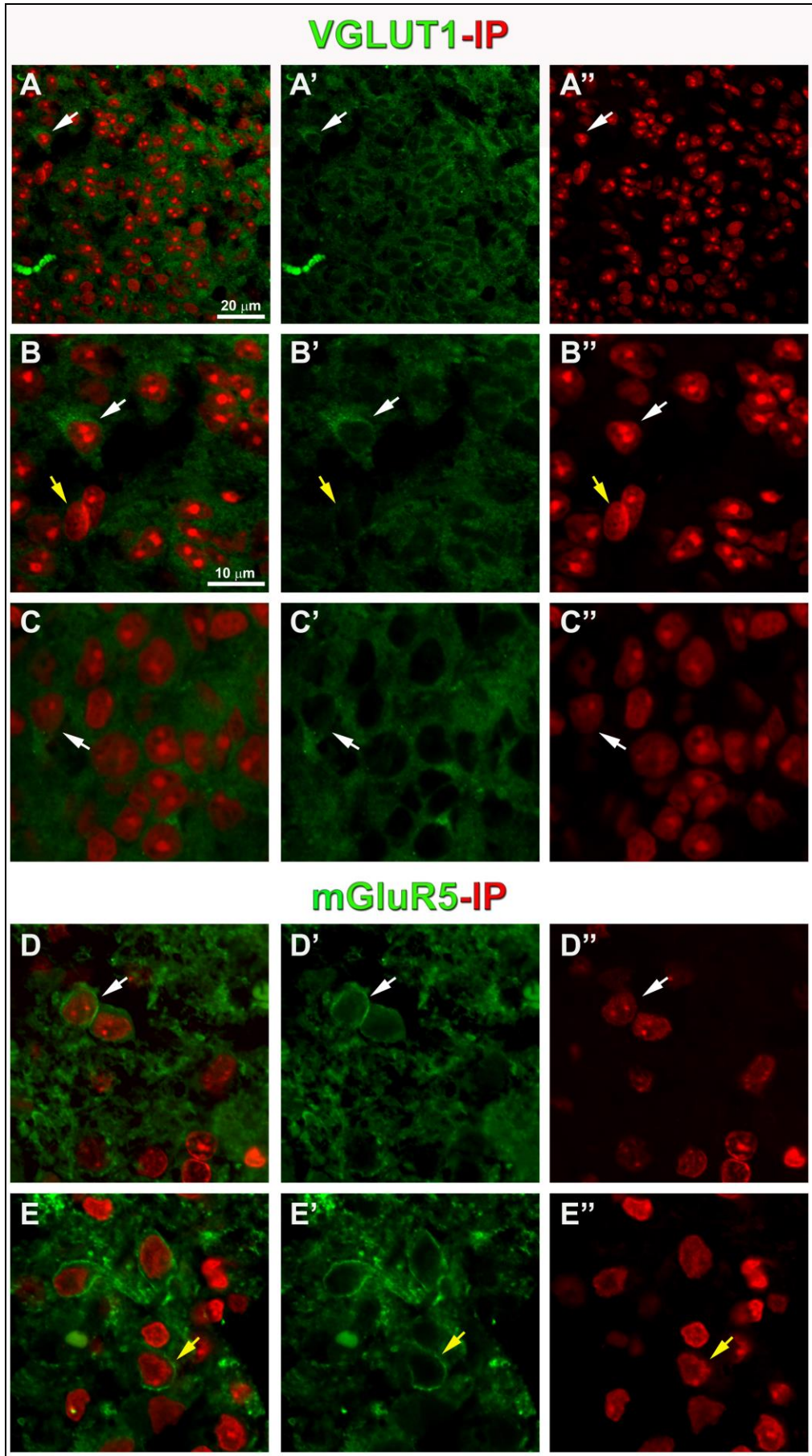
El objetivo primario de esta Tesis fue definir y caracterizar las poblaciones celulares GABAérgicas de la glándula pineal. Sin embargo, a medida que avanzamos en los estudios nos dimos cuenta que para analizar la funcionalidad de estas células no podíamos dejar de lado al sistema glutamatérgico. Está muy bien establecido que existe una estrecha relación entre ambos sistemas a tal punto que sus funciones suelen complementarse. Moriyama y cols. [144, 150, 157, 159, 237] llevan mucho tiempo investigando la naturaleza glutamatérgica de los pinealocitos y su efecto sobre la síntesis de melatonina, por lo que este sistema está mucho más estudiado que el GABAérgico. Nosotros nos abocamos a identificar dos componentes fundamentales de la vía glutamatérgica para corroborar los datos de este grupo y contrastarlos con los que obtuvimos para el sistema GABAérgico.

## **Los pinealocitos tendrían la capacidad de almacenar glutamato en vesículas y responder a su estímulo**

Estudiamos dos componentes del sistema glutamatérgico, el receptor metabotrópico mGLUR5 (del inglés *metabotropic glutamate receptor 5*) y el transportador de membrana vesicular VGLUT1 (del inglés *vesicular glutamate transporter 1*), necesario para cargar el glutamato en las microvesículas secretorias. Al VGLUT1 lo detectamos en la mayoría de

los pinealocitos, aunque no en todos con la misma intensidad, evidenciando la heterogeneidad de las principales células de la GP (FIG. 37 A-C''). A su vez corroboramos que células intersticiales no contienen al transportador vesicular de glutamato en sus citoplasmas (FIG. 37 B-B'').

En cuanto al mGLUR5 lo localizamos en la superficie de pinealocitos y células intersticiales, pero con intensidad variable de una célula a la otra (FIG. 37 D-E'')



### **FIG. 37: Marcadores glutamatérgicos en la GP de rata adulta**

A-C'') IHQ para VGLUT1 (verde). Núcleos marcados con IP (rojo). La mayoría de los pinealocitos expresan VGLUT1 aunque con diferente intensidad (flechas blancas) mientras que las células intersticiales no lo expresan (flecha amarilla). En el canal rojo se puede apreciar la morfología diferencial de los núcleos. D-E'') IHQ para mGluR5 (verde). Núcleos marcados con IP (rojo). El receptor metabotrópico de glutamato se localiza en una subpoblación de pinealocitos (flecha blanca) y células intersticiales (flecha amarilla). Microscopía confocal. A-A'') 60X, más zoom de 1.3X. B-E'') 60X, más zoom de 2.5X.

## **Efecto de la ganglionectomía en la glándula pineal**

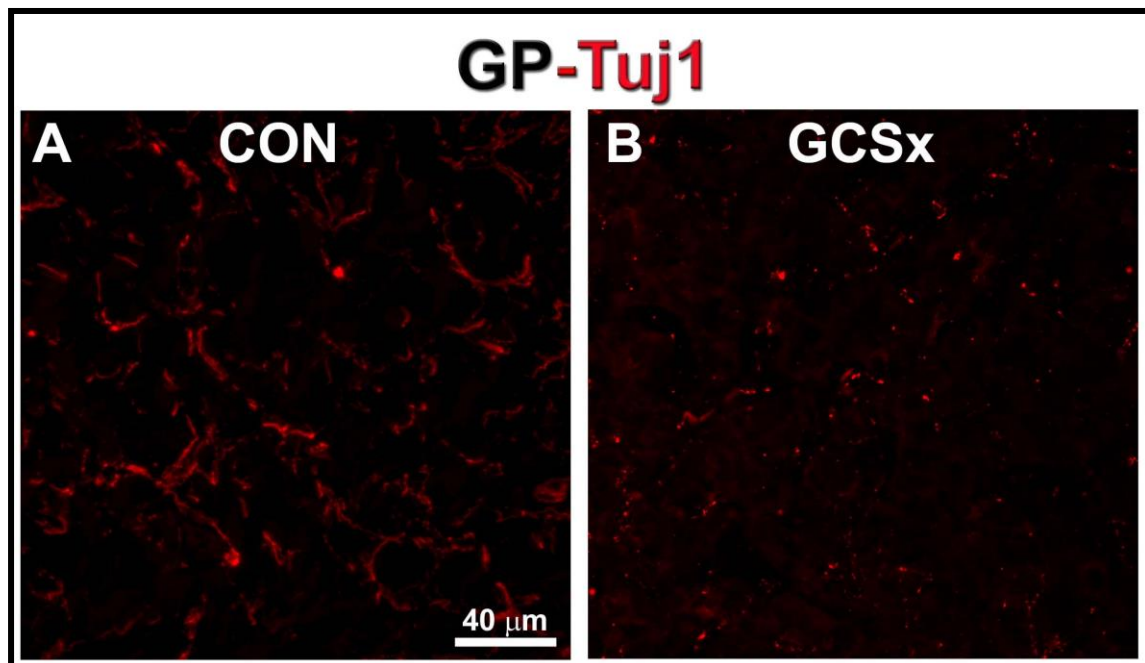
Una de las herramientas con las que contamos en nuestro laboratorio es la cirugía de remoción de los ganglios cervicales superiores (GCSx) que hemos descrito en la sección de Materiales y Métodos pág. 38. Este procedimiento libera a la GP de la regulación rítmica de la NA proveniente de los nervios conarios. Este modelo es muy útil para el estudio de los eventos rítmicos de la GP, ya que la mayoría de ellos se ven interrumpidos. En el presente trabajo buscamos analizar el efecto que la GCSx tendría sobre el sistema GABAérgico pero no pudimos encontrar variaciones significativas en el número de células GABAérgicas ni en la disposición de los receptores. Sin embargo, hemos logrado caracterizar varios aspectos de la GP de animales GCSx que resultan muy valiosos para nuestro laboratorio. Es importante destacar que cuando se lleva a cabo un análisis fino de las glándulas pineales provenientes de ratas GCSx, resultan notablemente diferentes a las de las ratas controles. Esto nos llevó a plantearnos la importancia de caracterizar los cambios fenotípicos generados por la falta crónica de inervación simpática, ya que los mismos van más allá de la simple disrupción de ritmos.

## **La inmunodetección de Tuj1 pone en evidencia el éxito de la ganglionectomía y el dominio de la inervación simpática**

La remoción de los cuerpos neuronales simpáticos en los ganglios causa la degeneración progresiva de las fibras nerviosas que penetran en la pineal. La visualización de las fibras nerviosas mediante el anticuerpo anti-Tuj1 en las GP controles y GCSx nos

permite evaluar el éxito de la cirugía. En la FIG. 38 se muestra la superposición de planos focales en el eje Z y por ende los dominios de la innervación simpática tanto en controles como ganglionectomizados. Las fibras Tuj1<sup>+</sup> en la GP experimental están claramente reducidas y discontinuas.

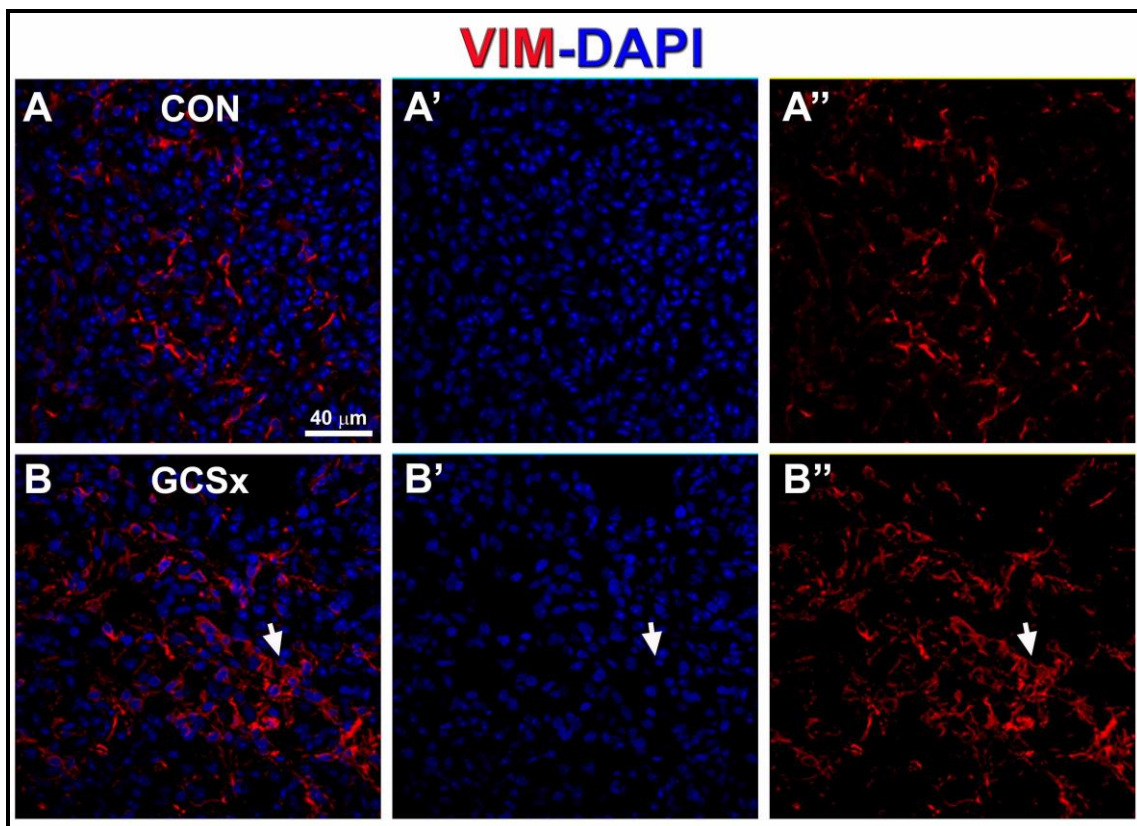
Los animales GCSx se sacrifican regularmente a las 3 semanas de la cirugía cuando la innervación simpática ha degenerado completamente. La escasa señal de Tuj1 que detectamos después de la GCSx crónica debería provenir de fuentes distintas a la simpática, incluida la innervación central. Lo que es evidente es que la innervación simpática es la más abundante que llega a la pineal.



**FIG. 38: Disminución de la marca de Tuj1 en la GP de animales GCSx**  
A-B) IHQ para Tuj1 (rojo). Se puede apreciar la disminución y la discontinuidad de las fibras nerviosas en la GP de animales GCSx. Microscopía confocal. A y B) 60X.

Las poblaciones celulares vimentina positivas aumentan y se agrupan en la glándula pineal proveniente de animales ganglionectomizados

Hemos observado que en las glándulas de animales GCSx la población intersticial VIM positiva aumenta en número y forman grandes grupos celulares que no son frecuentes en las controles (FIG. 39). Este aumento en el número de células podría originarse por migración desde regiones vecinas o por división y diferenciación intraglandular. El aumento de esta población celular podría generar un desbalance en la proporción normal de tipos celulares lo cual podría influir en toda la fisiología de la glándula. Tanto la población de precursores Pax6<sup>+</sup>/RGABA<sub>B</sub>1<sup>+</sup>/VIM<sup>+</sup> como las células GABAérgicas VIM<sup>+</sup> podrían estar afectadas en las GP de animales GCSx, sería necesario un análisis más exhaustivo para corroborar este aspecto.

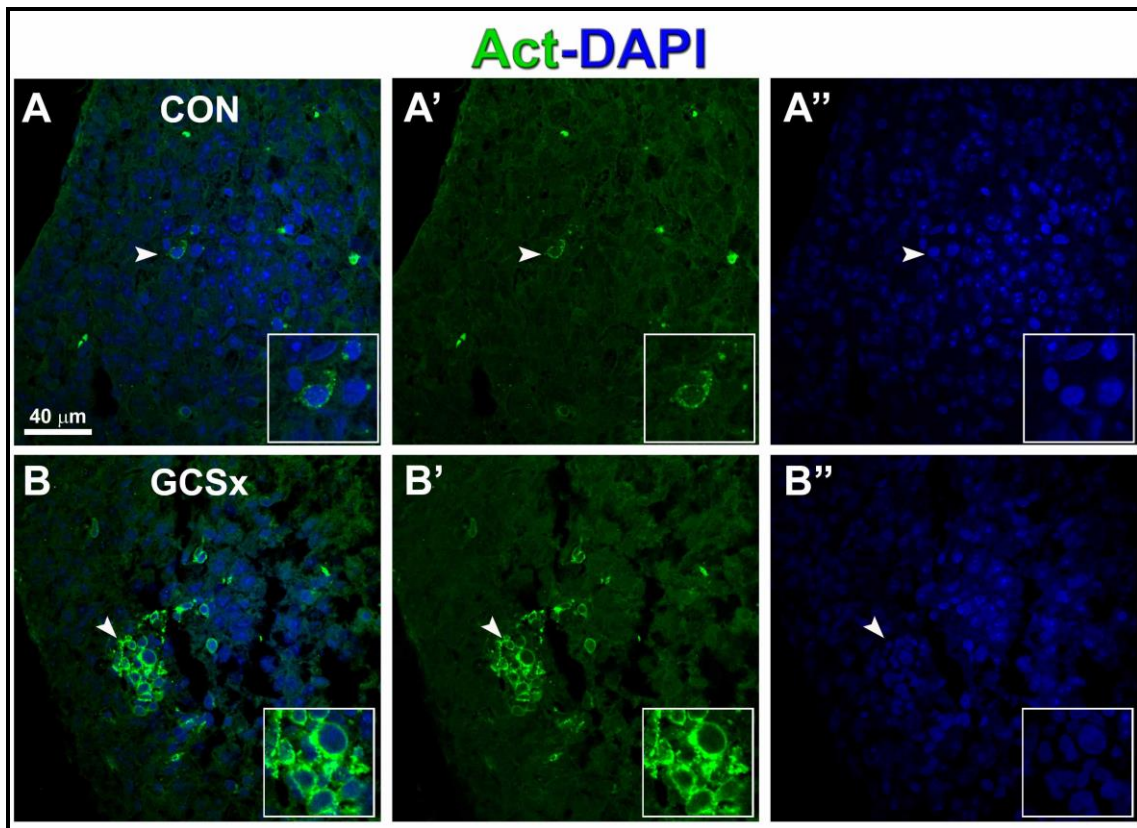


**FIG. 39: Cambios en el patrón de células VIM<sup>+</sup> en glándulas GCSx.**

A-B) IHQ para VIM (rojo). Núcleos marcados con DAPI (azul). Se puede apreciar el aumento y las agrupaciones de las células VIM<sup>+</sup> en la GP de animales GCSx. Microscopía confocal. A-B'') 60X.

La marcación de actina en la glándula pineal de animales ganglionectomizados pone en evidencia la formación de grandes aglomerados de celulares con morfología atípica

Observamos que la marcación del citoesqueleto de actina también nos permite ver diferencias entre las glándulas GCSx y las controles (FIG. 40). En las pineales GCSx aparecen ramilletes de células que presentan un citoesqueleto de actina muy marcado. Como mostramos anteriormente en la FIG. 36, estas células serían del tipo microglial, lo cual es indicativo que las GP de estos animales estarían bajo un proceso inflamatorio y/o transformación que iría más allá de la pérdida de ritmicidad.



**FIG. 40: Aumento de células microgliales activas ricas en actina en glándulas pineales GCSx.**

A-B'') IHQ para actina (verde). Núcleos marcados con DAPI (azul). Se puede apreciar el aumento de células tipo microglía con fuerte expresión de actina en la GP de animales GCSx. Las regiones señaladas por las cabezas de flechas se ven amplificadas (2X) en los recuadros inferiores. Microscopía confocal. A-B'') 60X.

## **Capítulo III**



## NeuroD1 como determinante de fenotipo

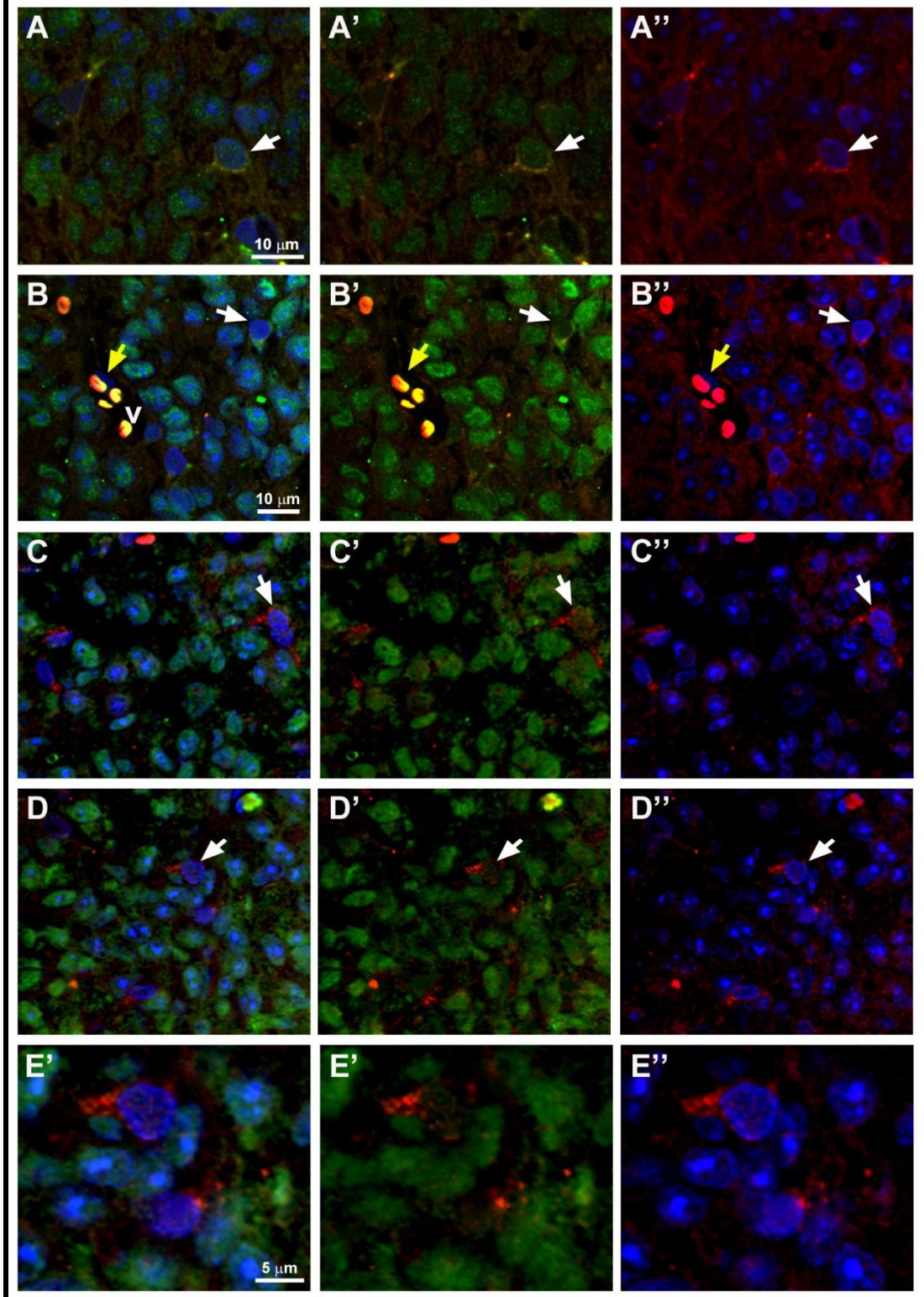
En nuestro laboratorio se caracterizó la distribución y dinámica del factor de transcripción NeuroD1 en la GP de rata en el desarrollo embrionario, neonatal y adulto. Este trabajo recientemente publicado formó parte de la Tesis doctoral de la Dra. Analía Castro, junto a la cual estandarizamos la detección del NeuroD1 [192]. Este bHLH se expresa en el primordio pineal desde los primeros estadios embrionarios y se mantiene hasta el estado adulto, en donde se localiza principalmente en pinealocitos, aunque también fue observado en una subpoblación de células intersticiales. En el desarrollo embrionario y los primeros estadios neonatales, la localización subcelular de este factor de transcripción es nuclear. A partir de P10 y en la GP adulta se encontró que la localización del NeuroD1 varía según el ZT analizado; durante la fase de luz (ZT6) NeuroD1 es principalmente citoplasmático mientras que en la noche temprana (ZT14) se localiza a nivel nuclear. Además, la localización nuclear nocturna del NeuroD1 en pinealocitos fue afectada por la disrupción de la innervación simpática de la glándula pineal vía la GCSx y por la administración *in vivo* de antagonistas específicos de los receptores adrenérgicos  $\alpha 1$  y  $\beta$ . El hecho de que NeuroD1 se exprese tan temprano en el desarrollo y que en el adulto su localización sea susceptible a regulación circadiana, avalaría su rol modulador en el establecimiento y mantenimiento del fenotipo pineal. En nuestro laboratorio trabajamos con la hipótesis de que en los estadios embrionarios tendría un rol como determinante fenotípico y en la adultez podría estar involucrado en funciones específicas como el ritmo circadiano de síntesis y secreción de melatonina.

En el presente trabajo de Tesis buscamos relacionar la localización subcelular de la proteína NeuroD1 con las células GABAérgicas detectadas en la GP. Nuestro interés surgió a partir del análisis del transcriptoma de GP de ratones KO totales para *NeuroD1*, donde se observa que el gen que más aumenta su expresión es *Gad1* [191]. Como mencionamos en la Introducción, en la región regulatoria del gen *Gad1* se han identificado secuencias *E-box* que serían compatibles con las secuencias nucleotídicas de reconocimiento del NeuroD1.

## Los núcleos de las células GABAérgicas en la glándula adulta presentarían niveles bajos o nulos de NeuroD1

Mediante IHQ doble para NeuroD1 y GAD67 se observó que las células intersticiales GAD67 positivas mostraban una señal reducida o nula del factor de transcripción en sus núcleos (FIG. 41). En algunos casos se detecta NeuroD1 bien marcado en el citoplasma de estas células, indicando que se expresaría pero no cumpliría su rol de regulador transcripcional en dichas células. Dicha heterogeneidad podría estar indicando dos mecanismos de regulación de la actividad de NeuroD1, uno a nivel de la expresión de mensajero y proteína, y otra, a nivel de la translocación al compartimiento nuclear. Las imágenes de la FIG. 41 se obtuvieron de GP adultas colectadas a ZT14, cuando la localización del NeuroD1 en pinealocitos es principalmente nuclear.

# NeuroD1-GAD67-DAPI



**FIG. 41: Localización de GAD67 con respecto a NeuroD1**

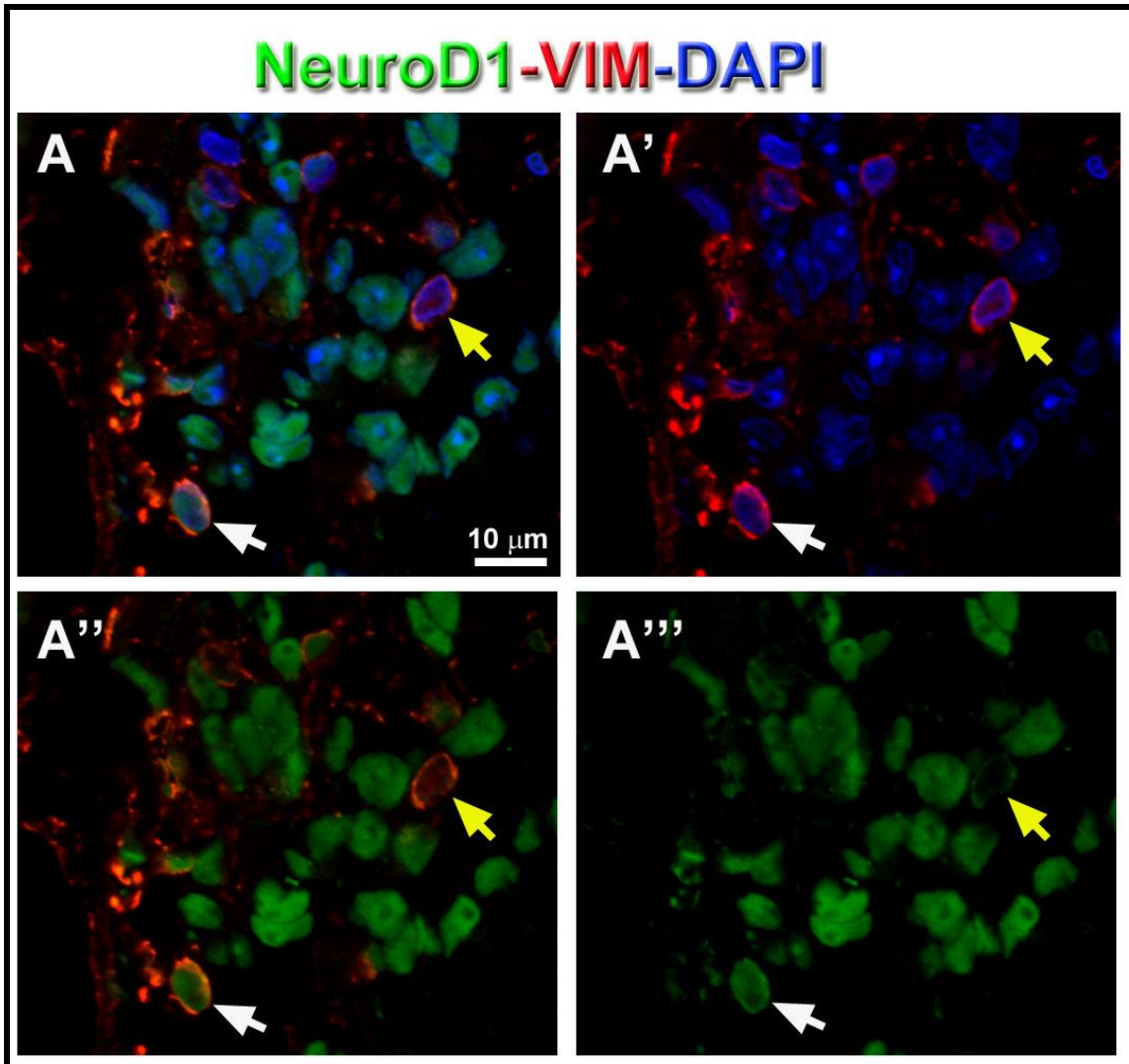
A-E'') IHQ doble para GAD67 (rojo) y NeuroD1 (verde). Núcleos marcados con DAPI (azul). Las flechas blancas indican células intersticiales GAD67 positivas con señal casi nula de NeuroD1 en sus núcleos o con señal débil en sus núcleos y fuerte en sus citoplasmas. Las células endoteliales no presentan ninguno de los marcadores (flecha amarilla). E-E'') Imagen a mayor aumento de la células señalada en D. Microscopía confocal. A-A'') 60X, más zoom de 3X. B-D'') 60X, más zoom de 2X. E-E'') 60X, más zoom de 4X.

Estos resultados estarían de acuerdo con el rol inhibitorio que hipotetizamos para NeuroD1 sobre la expresión del gen *Gad1*. Nosotros planteamos que en pinealocitos el NeuroD1 nuclear silenciaría directa o indirectamente a *Gad1*. Por lo tanto, al no estar NeuroD1 en los núcleos de una subpoblación de células intersticiales, la región regulatoria del gen *Gad1* estaría libre de la inhibición por el bHLH con la consecuente expresión de GAD67 y la producción de GABA por parte de estas células. De esta manera, NeuroD1 podría estar relacionado a la diferenciación y mantenimiento de fenotipos celulares dentro la glándula pineal, específicamente entre el fenotipo glutamatérgico y GABAérgico de pinealocitos y células intersticiales, respectivamente. Similares interpretaciones fueron hechas por Roybon y cols. [196] durante la especificación diferencial de subtipos neuronales en el desarrollo del cerebro anterior.

**Las células GABAérgicas estarían representadas por una subpoblación de células vimentina positivas sin NeuroD1 nuclear**

Como se mencionó anteriormente, NeuroD1 se expresa en pinealocitos y en una subpoblación de células intersticiales. Estas últimas células expresan VIM y dependiendo de la presencia o no del bHLH a nivel de sus núcleos se pueden diferenciar al menos dos subpoblaciones (FIG. 42). No se pudo confirmar por incompatibilidad técnica de anticuerpos, pero suponemos por morfología, abundancia y distribución que la población de células intersticiales VIM<sup>+</sup> sin NeuroD1 en sus núcleos son las GABAérgicas detectadas mediante anti-GABA y anti-GAD67. Las células que contienen NeuroD1 en sus núcleos también deberían expresar Pax6 ya que ambos factores de transcripción están relacionados

con la diferenciación glutamatérgica, es decir que estas células  $VIM^+/NeuroD1^+$  podrían ser las mismas que describimos en el Capítulo anterior como precursores  $Pax6^+/VIM^+/RGABA_B1^+$ . Al menos la abundancia y localización de dichas células intersticiales con los diferentes marcadores es coincidente. Cabe destacar que tanto el anticuerpo para NeuroD1 (6300) como el de Pax6 fueron generados en conejo por lo que son incompatibles para realizar ensayos de doble IHQ confiables.



**FIG. 42: NeuroD1 se localiza en los núcleos de una subpoblación de células intersticiales VIM positivas.**

A-A''') IHQ doble para VIM (rojo) y NeuroD1 (verde). Núcleos marcados con DAPI (azul). La flecha blanca indica una célula  $VIM^+/NeuroD1^+$  y la flecha amarilla una célula  $VIM^+/NeuroD1^-$ . Microscopía confocal. A-A''') 60X, más zoom de 2.5X.

## NeuroD1 como determinante de fenotipo en las poblaciones celulares cerebelares.

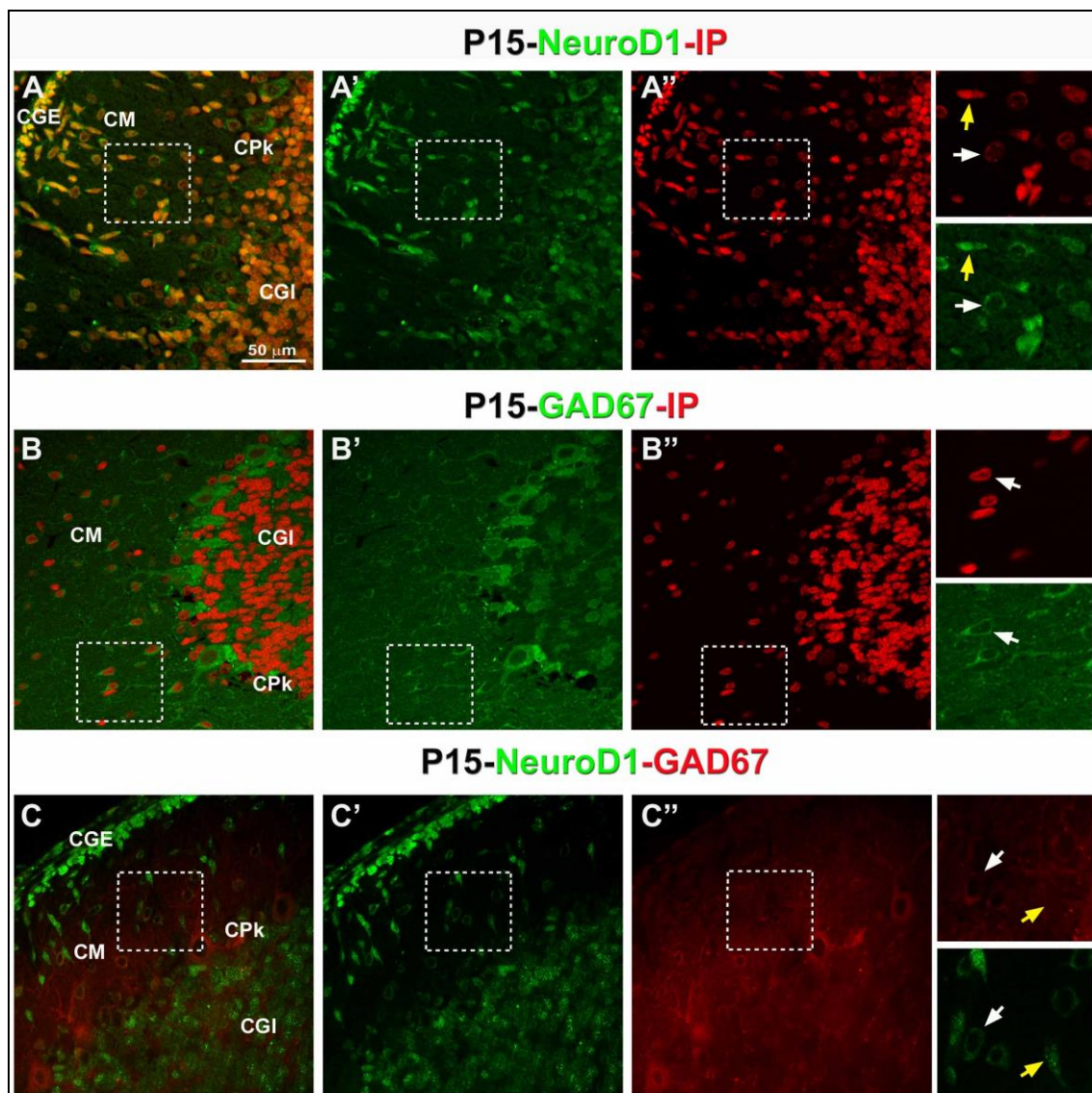
Como mencionamos anteriormente, el cerebelo ha constituido el control positivo del presente trabajo de Tesis, fundamentalmente por la abundancia y dinamismo de marcadores glutamatérgicos y GABAérgicos. En el trabajo que realizamos en colaboración la Dra. Alicia Seltzer analizamos las poblaciones neuronales GABAérgicas y glutamatérgicas en cerebelos de ratas en el día postnatal 15 (P15) [225]. El abordaje de este órgano en estadíos donde aún se suceden los procesos de proliferación, diferenciación y migración neuronal, nos brindó la oportunidad de evaluar el desarrollo de poblaciones GABAérgicas y glutamatérgicas y su relación con NeuroD1. De esta manera pudimos confrontar los resultados obtenidos en GP con los de cerebelo.

En el estadío analizado el cerebelo ya se encuentra laminado, pudiéndose distinguir la CGE, la CM, la CPk y la CGI. De la CGE se originan las células glutamatérgicas de la CGI que son las más abundantes en el cerebelo, por lo tanto la primera es una fuente de células que migran de forma centrípeta o radial a través de la CM. Los otros tipos celulares del cerebelo son de naturaleza GABAérgica y se clasifican en células de Purkinje, Golgi II, en cesto y estrelladas.

Todas las células de la CGE contienen NeuroD1 en sus núcleos y su expresión se mantiene mientras migran a través de la CM y en su destino final, la CGI (FIG. 43). En el cerebelo adulto estas células siguen expresando el factor de transcripción, al igual que lo que sucede con los pinealocitos de la GP. El factor NeuroD1 fue muy efectivo en la identificación de las neuronas glutamatérgicas en las distintas capas del cerebelo. La localización del bHLH es completamente nuclear en estas células, sin embargo observamos células principalmente en la CM en las que la señal se localizó en el citoplasma. Estas células con núcleos NeuroD1 negativos en la CM tienen forma redondeada a diferencia de las granulares que al estar migrando a través de esta capa, presenta una forma ahusada (FIG. 43 A-A'' e *inset*). En base a su morfología y localización pensamos que estas células redondeadas podrían ser las futuras neuronas GABAérgicas residentes de la CM. Para confirmar esto, realizamos la IHQ para GAD67 y encontramos que estas células contienen la enzima en sus citoplasmas, por lo que serían GABAérgicas (FIG. 43 B-B'' e *inset*).

Además se observan células con sus citoplasmas marcados con GAD67 en la CGI que podrían ser las Golgi II.

Finalmente realizamos la doble IHQ para GAD67 y NeuroD1 en los cerebelos P15 y confirmamos que en las células GABAérgicas de la CM colocalizan ambas señales en sus citoplasma (FIG. 43 C-C'' e *inset*); esta es la misma situación que detectamos en la subpoblación de células intersticiales GABAérgicas de la GP.



**FIG. 43: Relación entre GAD67 y NeuroD1 en cerebelo de rata P15.**

A-A'') IHQ para NeuroD1 (verde). Núcleos marcados con IP (rojo). NeuroD1 se localiza en los núcleos de las células de la CGE, la CGI y las células que migran a través de la CM (flecha amarilla). También se puede apreciar marca en el citoplasma de algunas células en la CM (flecha blanca). B-B'') IHQ para GAD67 (verde). La enzima se detecta en el citoplasma de las células de Purkinje, en células de la CM (flecha blanca) y en algunas células en la CGI. C-C'') Doble IHQ para GAD67 (rojo) y NeuroD1 (verde). Se observan células migrando a través de la CM con sus núcleos elongados fuertemente marcados para NeuroD1 y sin expresión de GAD67 (flecha amarilla) y células con forma más redondeada que expresan GAD67 y NeuroD1 en sus citoplasmas (flecha blanca). Los recuadros punteados indican las regiones amplificadas (2X) mostradas a la derecha de las imágenes y que destacan a las células antes mencionadas. Microscopía de fluorescencia convencional. A-C'') 40X.

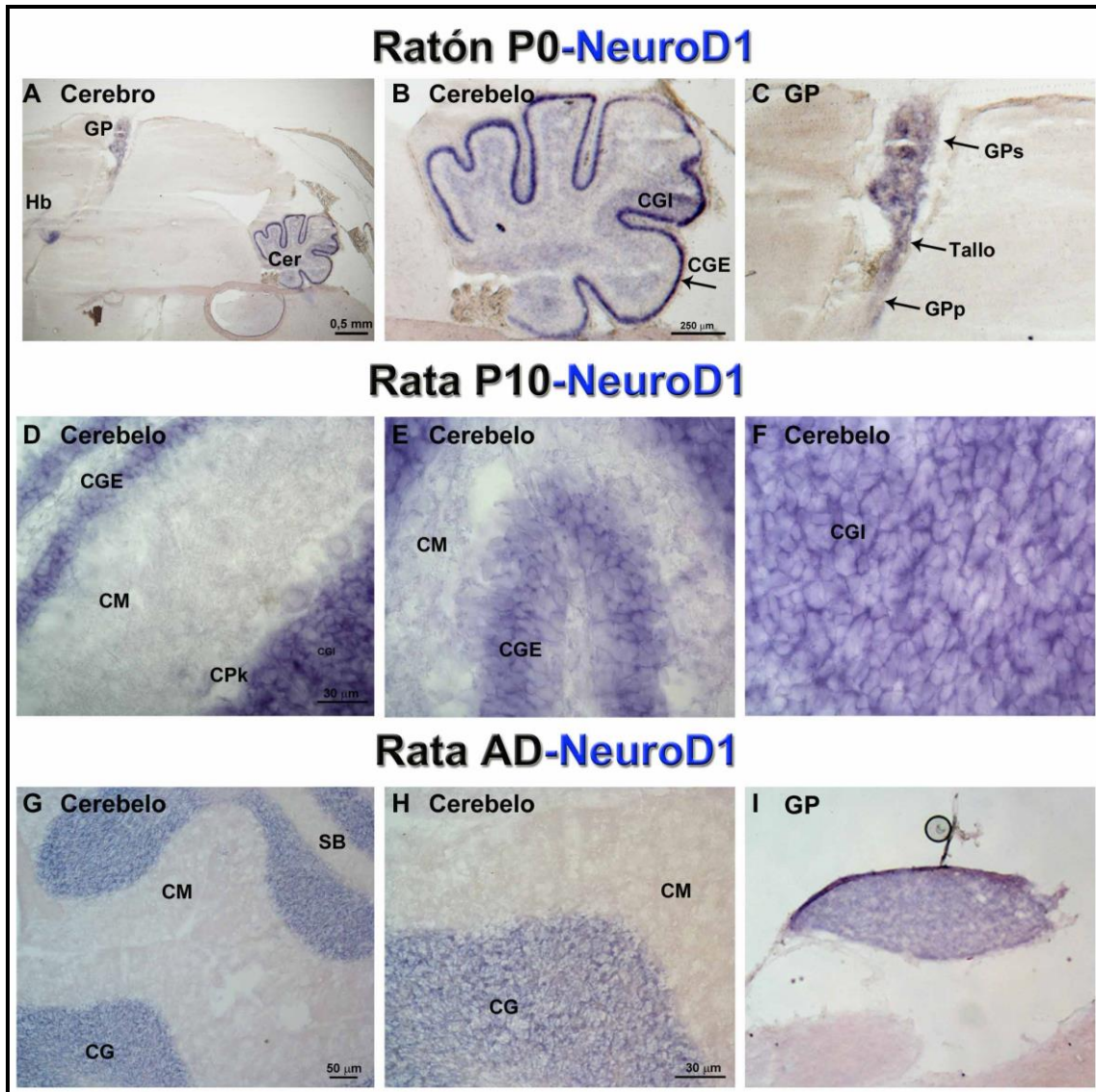
## Dominios de expresión de NeuroD1 en el desarrollo de la pineal y el cerebelo

Por medio de la técnica de hibridación *in situ* (HIS) analizamos los dominios de expresión de NeuroD1 en el cerebelo y GP en desarrollo. En la FIG. 44 A-C, se muestran los dominios de expresión de NeuroD1 en un cerebro de ratón en estadio P0. Podemos observar la presencia del ARNm en el cerebelo, la GP y en la región habenular (FIG. 44 A). En las imágenes a mayor aumento del cerebelo se puede determinar que la CGE es la región de mayor expresión, siendo la CGI ligeramente diferenciada (FIG. 44 B). En la GP superficial se detecta una señal fuerte pero heterogénea, indicando que NeuroD1 estaría siendo expresado diferencialmente por las células de la GP en desarrollo. La señal también es observada en el tallo y en la GP profunda (FIG. 44 C).

También se analizaron los dominios de expresión de NeuroD1 en el cerebelo de rata neonatal P10. Las regiones de expresión de este factor de transcripción están confinadas a la CGE y la CGI, lo cual es coincidente con la localización de la proteína mostrada en la FIG 43, de esta manera corroboramos la especificidad del mismo. Sin embargo, la HIS no fue lo suficientemente sensible para detectar al ARNm en las células positivas que migran a través de la CM.



En la rata adulta la expresión de NeuroD1 solo se puede observar en las células granulares (FIG. 44 G y H). Al igual que cerebelo, la GP mantiene la expresión en la mayoría de los pinealocitos adultos (FIG. 44 I). Ambas poblaciones celulares comparten la naturaleza glutamatérgica.



**FIG. 44: Dominios de expresión de *NeuroD1* en el desarrollo del cerebelo y en la GP.**

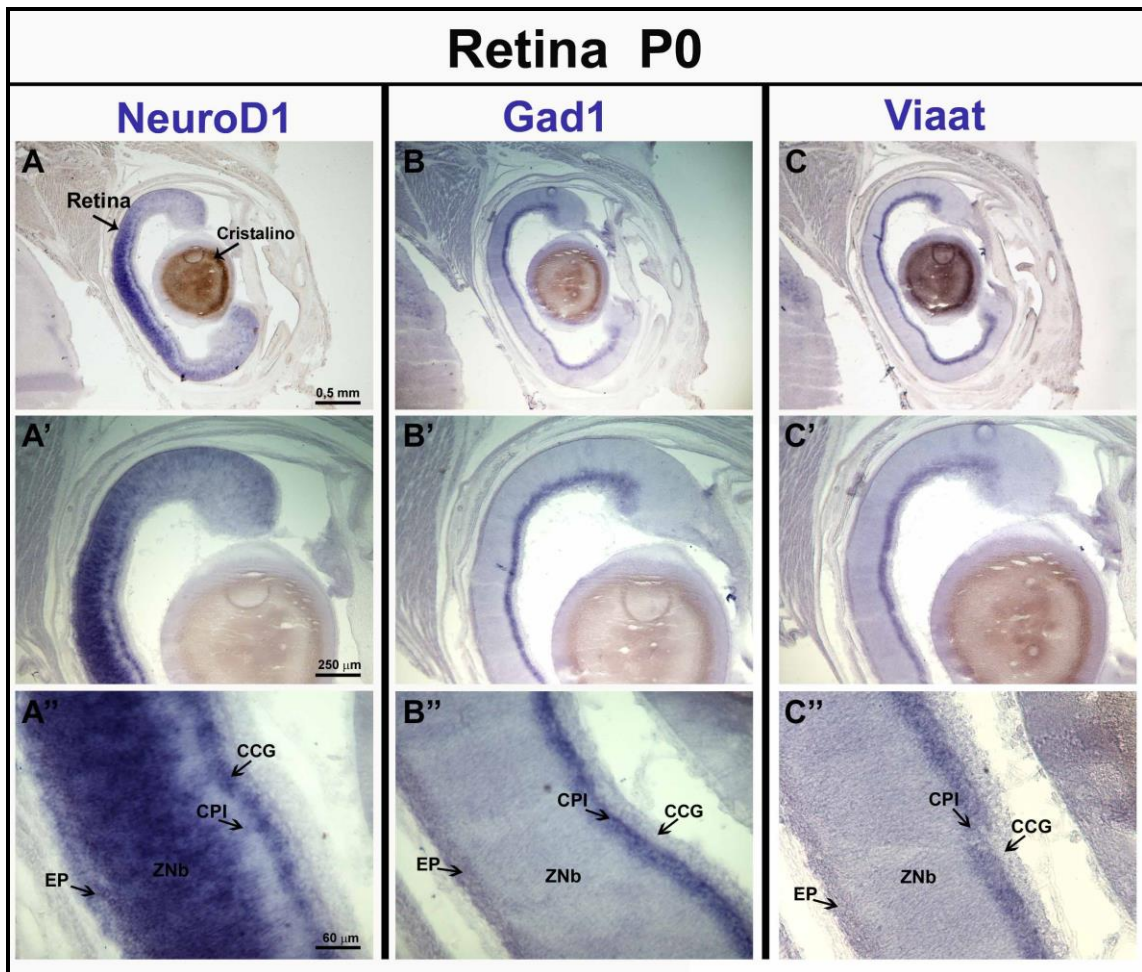
A-I) HIS para el ARNm del *NeuroD1*. A-C) Corte de cerebro de ratón neonatal P0. A) A bajo aumento se puede apreciar la marca azul de los dominios que expresan *NeuroD1* a P0. B) Cerebelo a mayor aumento: se puede observar la señal en la CGE y más débilmente en la CGI en formación. C) La GP presenta un marcado heterogéneo tanto en la superficie como en el tallo y la región profunda. D-F) Cerebelo de rata P10: se pueden apreciar los dominios de expresión de *NeuroD1* que se corresponden con CGE y CGI. G-H) Cerebelo adulto, el dominio de expresión de *NeuroD1* se limita a la CG. I) GP adulta con altos niveles de expresión de *NeuroD1*. Microscopía óptica. A) 4X. B y C) 40x. D-F y H) 60X. G e I) 40X.

**En retina neonatal *NeuroD1* presenta un dominio de expresión complementario al de los marcadores GABAérgicos *Gad1* y *Viaat***

En la retina de ratones recién nacidos (P0) tuvimos la oportunidad de analizar los dominios de expresión de los mensajeros de *NeuroD1* y de dos genes fundamentales para el sistema GABAérgico, el que codifica para la enzima biosintética del GABA (*Gad1*) y para el transportador que lo almacena en vesículas (*Viaat*). En la FIG. 45 A-A'' se presentan imágenes de la retina completa donde se puede apreciar que la expresión de *NeuroD1* no es homogénea, presentando mayor intensidad en la región media donde se ubican los precursores de las células fotorreceptoras las cuales son altamente dependiente de ese y otros bHLH [191, 193]. Por su parte los marcadores GABAérgicos presentan dominios muy similares entre ellos (FIG. 45 B-C''). Del análisis de las señales se puede inferir que los marcadores GABAérgicos y *NeuroD1* se localizan en poblaciones celulares diferentes ya que los dominios no se superponen y muestran una distribución aparentemente complementaria.

El dominio del *NeuroD1* se encuentra dividido por la incipiente capa plexiforme interna (CPI); la expresión se extiende por la zona neuroblástica que comprende desde el epitelio pigmentario (EP) hasta la CPI y luego vuelve a haber expresión en la capa de las células ganglionares (CCG) de naturaleza glutamatérgica (FIG. 45 A''). La CPI no

presenta marca para NeuroD1 y es justamente en esta región donde detectamos a los ARNm de *Gad1* y *Viaat* (FIG. 45 B-C''). Esto coincide con la ubicación de los precursores de las células amacrin de naturaleza GABAérgica que se alojan en la CPI en el límite de la CCG [238, 239]. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que NeuroD1 estaría favoreciendo el fenotipo glutamatérgico en detrimento del GABAérgico en un órgano tan relacionado a la GP como lo es la retina.



**FIG.45: Comparación de los dominios de expresión de NeuroD1 con dos genes GABAérgicos en la retina de ratón P0.**

A-C'') HIS en ojo de ratón P0. A-A'') NeuroD1. B-B'') Gad1. C-C'') Viaat. NeuroD1 presenta un dominio extenso desde el epitelio pigmentario (EP) hasta la capa de células granulares (CCG) dividido por la capa plexiforme interna (CPI). Los genes GABAérgicos presentan un dominio similar entre ellos y se limitan a la región de la CPI en contacto con la CCG. ZNb: zona neuroblástica. Microscopía óptica. A, B y C) 20X. A', B' y C') 40X. A'', B'' y C'') 60X.

## **Capítulo IV**

## Análisis de la función fisiológica del GABA en la glándula pineal

Como se menciona en la Introducción de la presente Tesis, existen controversias entre los trabajos que hacen referencia al efecto de la manipulación de componentes del sistema GABAérgico sobre la síntesis y secreción de melatonina [135, 139-142]. Los experimentos citados han sido realizados *in vitro* con pinealocitos disgregadas o cultivos organotípicos. Además de la distribución temporal y espacial de los elementos GABAérgicos mostrados en los Capítulos anteriores, nosotros iniciamos el estudio de la funcionalidad mediante la manipulación farmacológica *in vivo* e *in vitro* de los RGABA<sub>A</sub> y sus consecuencias sobre los niveles de serotonina glandular, intermediaria en la vía de la melatonina.

En cuanto al diseño experimental, tuvimos en cuenta la cinética de la serotonina pineal descrita por Sun y cols. [54], quienes propusieron un perfil de tipo trifásico con un pico en las primeras horas de la fase de oscuridad que precede al de melatonina, para luego decaer alrededor del ZT18 (mitad de la noche) a valores de hasta 2 veces por debajo de los diurnos. Los autores demostraron que el incremento nocturno agudo de serotonina es dependiente de NA. Por otro lado, el impacto de la NA en los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos desencadena la exocitosis dependiente de  $Ca^{+2}$  de la serotonina vesicular, la cual actuaría de manera autocrina y paracrina sobre los receptores 5-HT<sub>2C</sub> (del inglés *5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptor*) de los pinealocitos potenciando la síntesis de melatonina inducida por NA [240, 241]. Cabe destacar que la serotonina se localiza en el citoplasma de los pinealocitos tanto en vesículas como en forma libre, y esta última es la que sirve como sustrato de la enzima AANAT. Tanto el pico de serotonina como su liberación son eventos tempranos inducidos por la NA, es por ello que en nuestros protocolos los efectos fueron analizados 3 y 4 horas posteriores a la manipulación farmacológica, cuando los niveles de serotonina deberían relacionarse inversamente con los de melatonina.

## Efecto de la manipulación *in vivo* de los RGABA<sub>A</sub> sobre el contenido de serotonina glandular

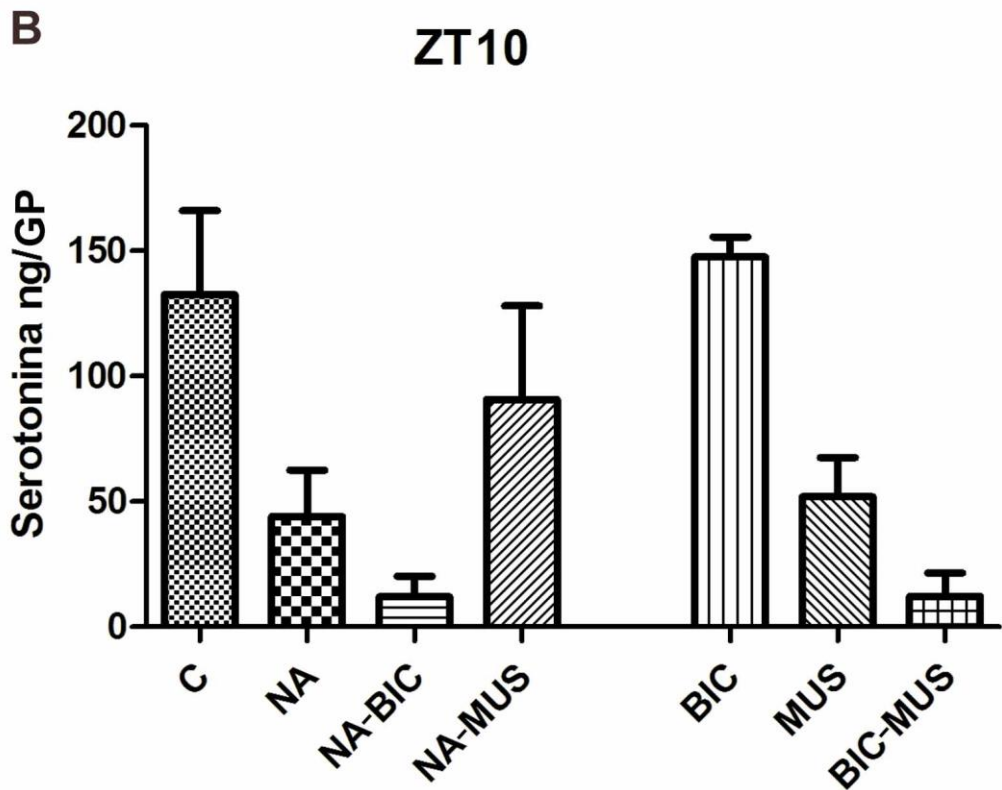
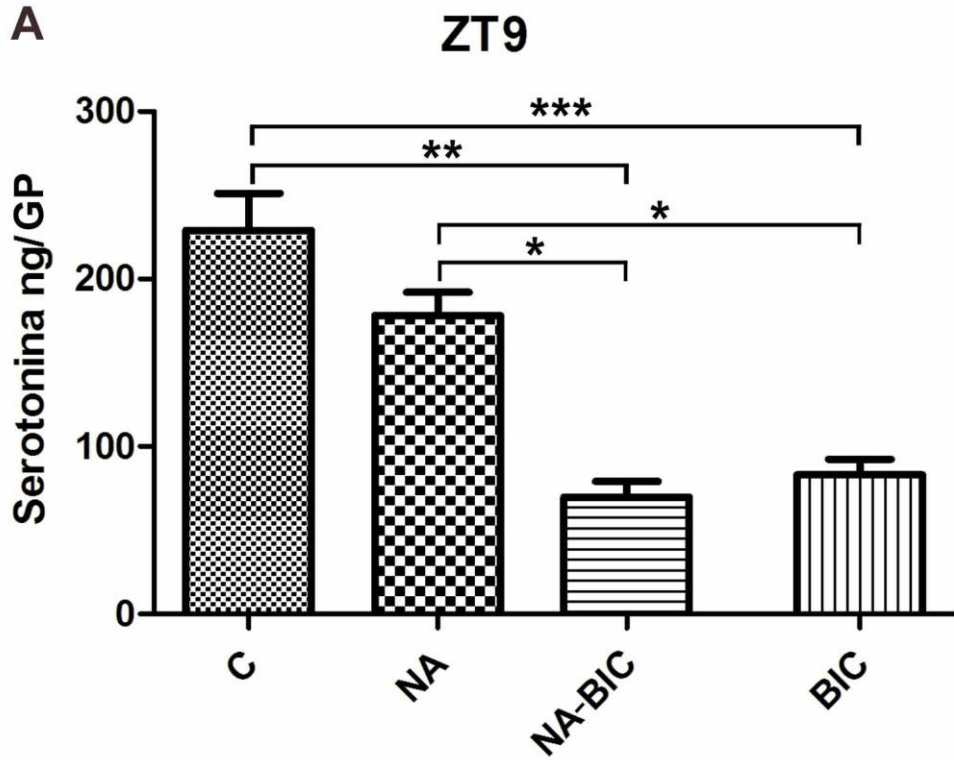
Se realizaron ensayos farmacológicos *in vivo* mediante inyecciones intraperitoneales (i.p.) de agonista y antagonista de los RGABA<sub>A</sub>. Se avaló el efecto de las drogas sobre los niveles de serotonina en GP individuales determinados mediante HPLC. El abordaje experimental consistió en la administración de manera intraperitoneal de 1 mg de NA por Kg de peso corporal durante la fase de luz, específicamente a ZT6, con el fin de mimificar el impulso simpático nocturno. También se realizaron inoculaciones estereotáxicas de NA en las cavidades ventriculares del cerebro y al no observarse diferencias con la administración i.p. se continuó con este último método por ser más práctico, reproducible y no requerir el uso de anestesia durante la manipulación. La inducción de la producción de melatonina durante la fase de luz es un modelo que ha sido utilizado en varios trabajos [54, 240]. Mediante la inyección diurna de NA nos propusimos independizarnos de la liberación nocturna normal de la catecolamina por parte de los nervios conarios y lograr un sistema más controlado.

Para manipular a los RGABA<sub>A</sub>, ratas adultas machos fueron inyectadas i.p. con 1mg/Kg de peso corporal de muscimol (MUS, agonista) y/o 1mg/Kg de bicuculina (BIC, antagonista) en presencia o ausencia de NA.

Tanto en el primer experimento del tipo ZT6-ZT9 (tiempo de inyección y toma de muestra, respectivamente) como en el segundo, ZT6-ZT10, se observó que los niveles de serotonina en glándulas pineales de ratas inyectadas con NA muestran una tendencia negativa frente a las controles inyectadas con solución fisiológica (FIG. 46). Estos resultados estarían indicando que el protocolo aplicado fue funcional y que la caída del precursor frente al estímulo adrenérgico podría ser atribuida a su conversión a melatonina y/o secreción. En ambos experimentos la co-administración de NA y el antagonista de los RGABA<sub>A</sub>, bicuculina, potenció la reducción de serotonina glandular, mientras que la inyección del agonista MUS, en el ensayo ZT6-ZT10, amortiguó el efecto adrenérgico. Estos resultados nos llevan a inferir que el GABA, a través de receptores ionotrópico, tendría una acción inhibitoria sobre la síntesis de melatonina. A pesar que los ensayos inmunohistoquímicos presentados en el Capítulo II mostraron la presencia de la subunidad  $\alpha 1$  en fibras nerviosas pero no en pinealocitos, los mismos no descartan la presencia de receptores pentaméricos compuestos por otras subunidades en el principal tipo celular de la GP. En otras palabras, nuestros resultados no descartan que la potencial acción inhibitoria del GABA sobre melatonina pueda ser del tipo post-sináptica.

Por otra parte, cuando se administró BIC sola las tendencias observadas en los niveles de serotonina glandular fueron diferentes en ambos experimentos, no así para el agonista o la combinación de agonista y antagonista. El perfil trifásico de serotonina en la GP normal y la posibilidad de múltiples puntos de acción de GABA en dicho órgano, explicarían parcialmente las divergencias entre protocolos pero también nos desafían a seguir profundizando en la cinética de las interacciones entre vías adrenérgicas y dependientes de GABA.

Si bien se considera en general que los experimentos *in vivo* aportan un panorama más real que los realizados *in vitro*, los primeros están sujetos a una mayor variabilidad debido a la acción global de los neurotransmisores y receptores bajo estudio, los cuales median diversas funciones tanto generales como específicas como en la modulación las diferentes estaciones de relevo del sistema circadiano. Es por ello que en el afán de simplificar, iniciamos el estudio en GP en cultivo.





### **FIG. 46: Manipulación farmacológica *in vivo* de los RGABA<sub>A</sub>**

Esquema del protocolo experimental utilizado: línea temporal indicando los ZTs y las fases de luz (línea blanca) y de oscuridad (línea negra). La jeringa indica el momento de la inyección i.p. de las diferentes drogas (ZT6) y las cabezas de flechas los dos momentos de toma de muestras (ZT9 y ZT10). A) El gráfico representa los resultados obtenidos a ZT9 donde se puede apreciar la reducción en los niveles glandulares de serotonina inducida por la NA con respecto al grupo control, caída que se ve potenciada significativamente con la co-administración de BIC, antagonista de los RGABA<sub>A</sub>. Dicho antagonista por sí solo redujo significativamente la serotonina glandular. B) El gráfico muestra los resultados obtenidos a ZT10 donde se puede apreciar que la tendencia para los grupos NA y NA-BIC con respecto a las GP controles es similar a la obtenida a ZT9. En esta segunda experiencia se incluyó al agonista muscimol, el cual amortiguaría la caída de serotonina dependiente de NA. A diferencia del ZT9, BIC parece no tener efecto sobre la serotonina, mientras que MUS y MUS-BIC redujeron los niveles del indol. C: control. BIC: bicuculina. MUS: muscimol. NA: noradrenalina. Estadística: Análisis de varianza de una vía (ANOVA),  $F(0.91)=23.27$ ,  $p < 0.05$  (N=3). Post test de Tukey: un  $p < 0.05$  se consideró significativo; C vs. NA-BIC  $p= 0.0011$  (\*\*); C vs. BIC  $p= 0.0010$  (\*\*\*) ; NA vs. NA-BIC  $p=0.0102$  (\*); NA vs. BIC  $p=0.0112$  (\*).

## **Efecto de la manipulación *in vitro* de los RGABA<sub>A</sub> sobre el contenido de serotonina glandular**

Se trabajó con glándulas pineales aisladas en cultivo por tres días, en las cuales se estimuló la síntesis de melatonina con NA y se analizó el efecto de las drogas MUS y BIC sobre los niveles de serotonina glandular. Las drogas GABAérgicas (10  $\mu$ M) fueron agregadas 10 minutos antes que la NA (1  $\mu$ M) y se las dejó interaccionar por 3 hs hasta que se colectaron las glándulas. En los cultivos de GP a largo plazo se asume que los terminales simpáticos han degenerado, por lo que los cultivos carecerían de NA endógena. Precisamente, una de las estrategias del protocolo fue cambiar el medio de cultivo dos veces por día previo a la experimentación. Por lo tanto, los efectos de la manipulación farmacológica observados en este tipo de cultivos se deberían a una acción del tipo post-sináptica del GABA sobre las células de la GP y no pre-sináptica por ausencia de fibras nerviosas funcionales.

Notablemente, el perfil generado *in vitro* (FIG. 47 A, ANOVA:  $p < 0.05$ , significativo) se superpone con el mostrado en la FIG. 46 B (ANOVA:  $p < 0.05$ , significativo). El agregado de NA al medio reduce el contenido de serotonina de las

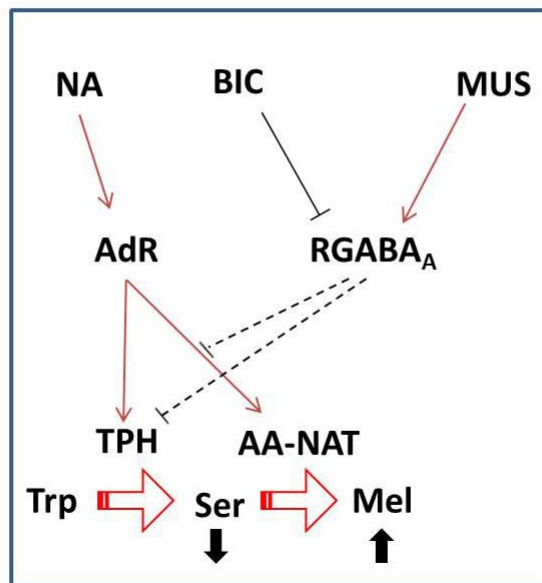
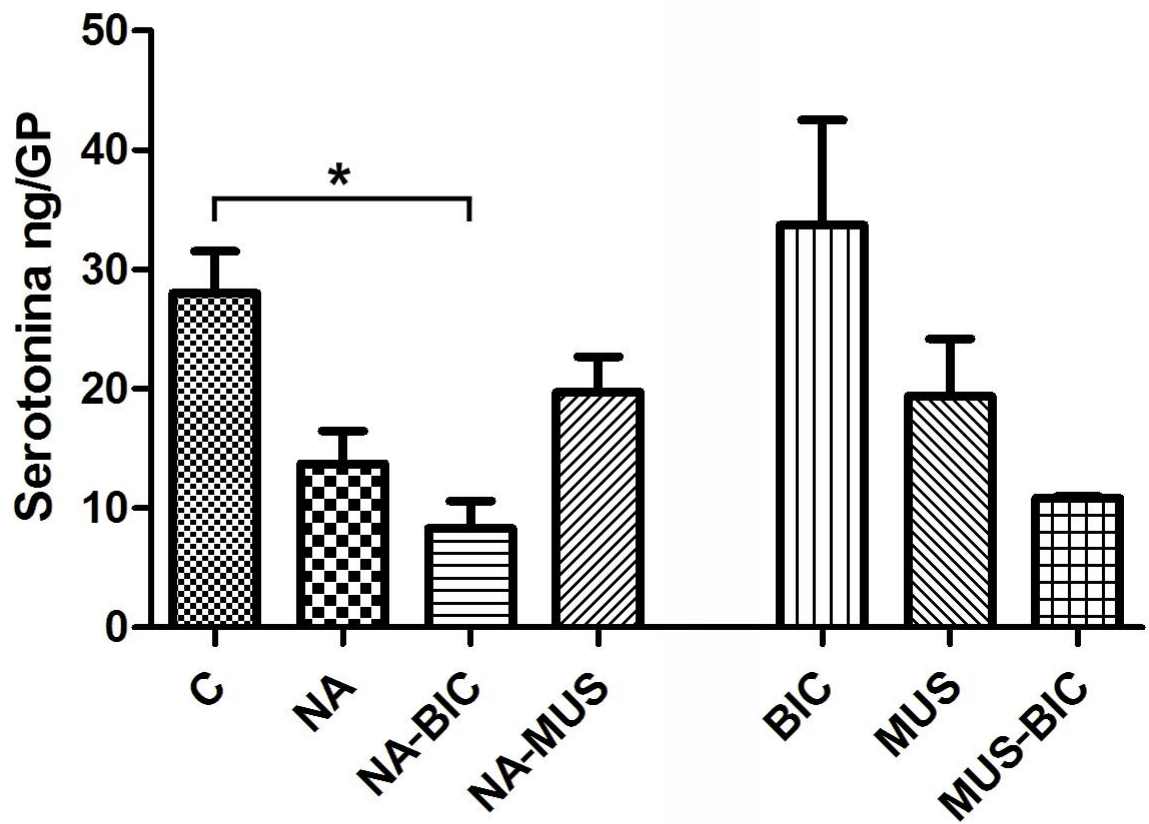
glándulas en cultivo, este efecto se ve potenciado por la BIC y parcialmente contrarrestado por el MUS. Estos resultados están de acuerdo con los publicado por Rosenstein y cols., quienes le atribuyeron al GABA un rol inhibitorio sobre la síntesis de melatonina [140].

La adición de BIC sola a los cultivos no parece afectar el contenido de serotonina glandular al igual que sucedió *in vivo* con el protocolo ZT6-ZT10. Por su parte, Rosenstein y cols. observaron que el agregado del antagonista producía un aumento en la síntesis de melatonina en cultivos sin estimular con NA exógena [140]. Esta diferencia puede deberse a que el citado grupo utilizó cultivos de GP de corto plazo con fibras simpáticas relativamente funcionales con capacidad de liberar espontáneamente NA endógena.

Tanto *in vivo* como *in vitro* (FIGS. 46 B y 47 A), MUS por sí solo produce una reducción en los niveles de serotonina la cual se debería a una acción directa de los RGABA<sub>A</sub> sobre la síntesis del precursor, su liberación y/o conversión en melatonina.

Los datos obtenidos al utilizar las drogas agonista y antagonista de los RGABA<sub>A</sub> sin el agregado de NA ponen de manifiesto que el GABA, más allá de su papel modulador sobre la acción de la NA, tendría una función por sí mismo sobre la biología pineal. Dilucidar este rol claramente requiere de un abordaje aún más profundo y con mejores herramientas. Los resultados de los Capítulos anteriores de esta Tesis sugieren que el GABA estaría implicado en múltiples procesos fisiológicos que probablemente interactúen de manera coordinada para mantener la homeostasis glandular.

## Cultivo



**FIG. 47: Manipulación farmacológica *in vitro* de los RGABA<sub>A</sub>**

A) El gráfico muestra los resultados obtenidos luego de la manipulación farmacológica de glándulas pineales en cultivo. El perfil de los diferentes grupos con respecto al control es similar al observado en el experimento *in vivo* a ZT10. El agonista muscimol amortigua la reducción del indol pineal causado por la NA, mientras que bicuculina la potencia. En ausencia del estímulo adrenérgico, bicuculina no tendría efecto sobre la serotonina mientras que muscimol y la mezcla de ambas drogas generan una caída. B) El esquema al pie de la figura muestra la posible relación entre las vías dependientes de la NA y del GABA sobre la síntesis de melatonina a partir de triptófano y con serotonina como intermediario. Las líneas continuas indican vías confirmadas por bibliografía y las punteadas potenciales. Están representados dos potenciales vías de acción inhibitorias de los RGABA<sub>A</sub>, una sobre la actividad de la encima TPH y otra sobre la activación de la NA sobre la actividad de la AANAT. Las flechas negras gruesas indican la relación inversa entre el precursor serotonina y el producto melatonina esperados al momento experimental analizado. AANAT: arilalquilamina N-acetiltransferasa. AdR: receptores adrenérgicos. 5-HT: serotonina. TPH: triptófano hidroxilasa. Trp: triptófano. Mel: melatonina. Estadística: Análisis de varianza de una vía (ANOVA),  $F(0.54) = 4$ ,  $p < 0.05$  (N= 4). Post test de Tukey:  $p < 0.05$  se consideró significativo; C vs NA-BIC  $p = 0.0104$  (\*).

En este Capítulo se expone una serie de experimentos que se realizaron a modo exploratorio con un número de animales discreto. Aunque algunos de los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles, las tendencias que se observan son muy interesantes y se ven reforzadas por dos puntos fundamentales: 1) obtuvimos datos concordantes entre el modelo *in vivo* (ZT6-ZT10) e *in vitro* y 2) nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores que sugieren un rol modulador del GABA sobre síntesis de melatonina inducida por la NA.

# **DISCUSIÓN**

## Rol del GABA en la glándula pineal de rata

Además del control neuronal simpático estimulador, es ampliamente aceptado que la síntesis de melatonina es modulada localmente por agentes de acción paracrina y/o autocrina, siendo el GABA y el glutamato dos de las moléculas propuestas. En la Introducción se describe la información más relevante hasta la actualidad sobre el rol potencial del GABA en la fisiología de la GP. Los estudios se iniciaron en la década de los setenta con el descubrimiento de la actividad de la enzima GAD y la recaptación de GABA en este órgano [134]. Desde entonces la temática fue abordada por varios grupos de investigación que buscaron relacionar a este neurotransmisor con la regulación de la melatonina. Hasta la década de los noventa se lo estudió intensamente y se logró proponer un rol modulador negativo sobre la síntesis de la hormona inducida por NA; no obstante, los datos generados resultan aun contradictorios [137-139, 141, 142, 242]. En los siguientes años unos pocos artículos hicieron referencia a marcadores GABAérgicos en la GP pero sin profundizar en la fisiología glandular [82, 143]. En contraparte surgieron grupos como el de Moriyama y cols. que han logrado avanzar mucho más en la caracterización del sistema glutamatérgico que opera en la GP y en su influencia en la vía de la melatonina [156, 160]. Este grupo ha realizado algunos experimentos involucrando al GABA y no han encontrado efectos del mismo sobre la regulación del indol [156]. Los pinealocitos son de naturaleza glutamatérgica y representan la mayor proporción de células de la GP, mientras que el GABA pareciera ser producido en un grupo muy pequeño de células intersticiales (Capítulo II, FIG. 22). Esta disparidad en la magnitud en la que estarían representados ambos sistemas en la GP adulta podría ser la causa de que se haya avanzado más sobre el sistema glutamatérgico que sobre el GABAérgico. En el presente trabajo nos encontramos con esta dificultad, por lo que optamos por dos estrategias. Por un lado ampliamos nuestro enfoque abordando el desarrollo del órgano y por otro nos focalizamos en la localización fina de los componentes del sistema GABAérgico (síntesis y recepción) y su relación con las diferentes poblaciones celulares de la GP adulta.

## Sistema GABAérgico en la glándula pineal embrionaria

Tanto la localización de los diferentes componentes del sistema GABAérgico como el rol del GABA en la GP embrionaria no han sido suficientemente explorados en la bibliografía. Debido a su ubicación y frágil anclaje al resto de la masa cerebral, la GP suele perderse en el procesamiento de la muestra y es frecuente excluirla de los estudios o atlas de cerebro donde suele mostrarse la distribución espacial de determinadas moléculas. Debido a nuestro interés por conservarla *in situ* es que pudimos avanzar en dicha temática.

Según nuestros resultados la fuente de GABA en la GP embrionaria estaría representada por terminales nerviosas centrales que llegan a ella a través del tallo, ya que no pudimos detectar células GABAérgicas propiamente dichas ni en el primordio ni en estadíos más avanzados (ver Capítulo I; FIG.8). El hecho de que no pudimos identificar células productoras de GABA en el tejido glandular embrionario es coherente con el efecto supresor de la diferenciación GABAérgica que se postuló y que nosotros planteamos para Pax6 y NeuroD1 en diferentes regiones del SNC [188, 196]. Nosotros encontramos que Pax6 se expresa en todas las células del primordio en E15 y a medida que avanzamos en el desarrollo sus niveles van disminuyendo (ver Capítulo I, FIGS. 6, 16 y 18). Además, en una publicación reciente de nuestro grupo se caracterizó la localización del NeuroD1 mediante un anticuerpo específico y se estableció que en el desarrollo embrionario de la GP todas las células contienen este factor de transcripción en sus núcleos [192]. Pax6 y NeuroD1 están presentes en los precursores de pinealocitos, pero la diferencia entre ellos radica en que NeuroD1 permanece a medida que avanza el desarrollo y podemos encontrarlo aun en los pinealocitos maduros. Al parecer el surgimiento de células con capacidad de sintetizar GABA en la GP se produciría postnatalmente y su origen embriológico no es claro.

El estudio de la recepción del GABA en la GP embrionaria resultó negativo al menos para las subunidades analizadas. La subunidad  $\alpha 1$  del receptor ionotrópico no pudo ser detectada en GP ni en el cerebelo embrionario (ver Capítulo I, FIGS. 10 y 11). Estas observaciones estarían de acuerdo con Fritschy y cols. [112] quienes encontraron que la inmunoreactividad de la RGABA $\alpha 1$  era baja y estaba restringida a una pocas áreas en el SNC de rata recién nacida, y que aumentaba drásticamente en los primeros días posnatales.

Por su parte la subunidad B1 del receptor metabotrópico tampoco parece expresarse en la GP en los estadios embrionarios, aunque sí la observamos en regiones vecinas, en el cerebelo y en otras áreas del SNC (ver Capítulo I, FIGS. 13-17). La expresión de esta subunidad en la GP la encontramos a partir de los primeros días postnatales (ver Capítulo I, FIG. 18) y se mantiene hasta la adultez; este aspecto será abordado más adelante.

Se sabe que la composición de los receptores GABA varía a lo largo del desarrollo y es probable que otras subunidades estén presentes en la etapa embrionaria por lo que no podemos descartar un rol del GABA sobre la glándula pineal en formación.

## Células GABAérgicas propias de la glándula pineal adulta

Además de las fibras, encontramos células propias de la glándula pineal con capacidad GABAérgica. Estas células se encuentran en baja proporción por lo que su identificación requirió de varios anticuerpos y cambios de protocolos en la IHQ (ver Capítulo II, FIG. 21). Una de las variables trabajada fue la de exposición de epitopes (ver Materiales y Métodos, pág. 39), logrando una estrategia que nos permitiera detectar claramente a las células y fibras GABAérgicas mediante el anticuerpo anti-GAD67, sin embargo dicho protocolo no fue útil para otros determinantes moleculares como el mismo GABA.

Las células GABAérgicas tienen características de intersticiales y expresan VIM (ver Capítulo II, FIG. 23). Las encontramos generalmente en regiones perivasculares y mediante marcadores específicos pudimos establecer que algunas de ellas guardan una relación estrecha con la pared de los vasos sanguíneos (ver Capítulo II, FIG. 29).

## El GABA regularía la fisiología vascular en la glándula pineal

La GP es la principal fuente de melatonina circulante. Esta hormona es producida exclusivamente en la noche por lo que es de esperar que el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular favorezcan dicha función. En este aspecto, el GABA proveniente de la inervación central y/o el producido por las células GABAérgicas propias de la glándula podría jugar un rol fundamental controlando la red vascular local.



Esta hipótesis surge de la observación de una amplia red de fibras nerviosas así como de células GAD67<sup>+</sup> que se distribuyen en el tejido glandular con un marcado tropismo por los vasos sanguíneos. La estrecha relación que observamos entre las fibras y los vasos sanguíneos nos llevó a investigar la influencia que pudiera tener el GABA sobre la fisiología vascular.

El GABA ha sido asociado a la regulación vascular en regiones tan diversas como el SNC [120], corazón [122], glándula adrenal [125] y retina [123]. Un estudio reciente realizado en glándula adrenal describe fibras GABA positivas que penetran en la glándula y parecen tener afinidad por los vasos sanguíneos, y además los autores encuentran que las células ganglionares también contienen este neurotransmisor [125]. En este trabajo, los RGABA<sub>B</sub> fueron observados en estas mismas células GABAérgicas que también sintetizan moléculas vasoactivas como el ON y el neuropéptido Y (NPY). Los autores sugieren que el GABA a través de receptores específicos tendría un rol inhibitorio sobre la secreción de células ganglionares y la motilidad vascular.

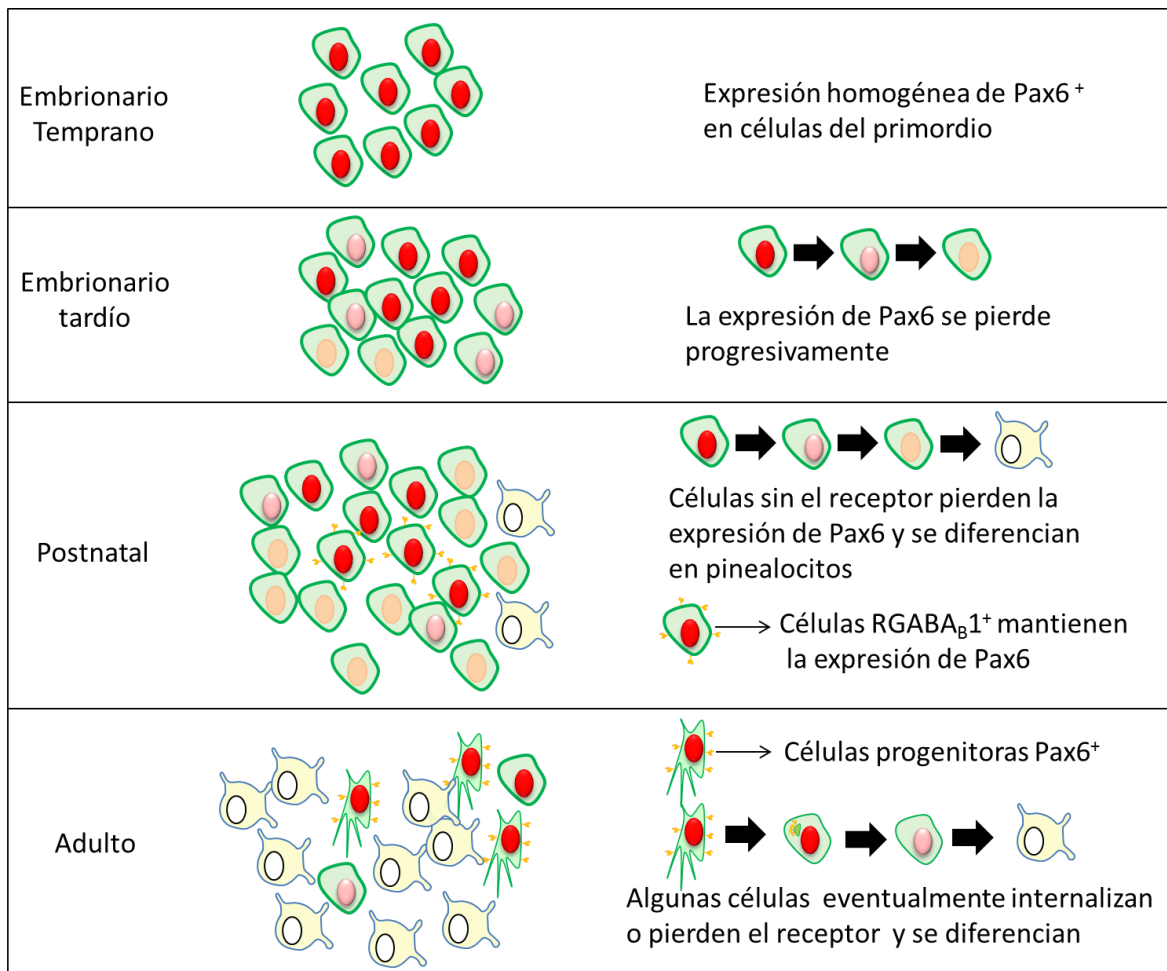
Nosotros encontramos al RGABA<sub>B</sub>1 en las membranas de las células que forman las paredes vasculares (ver Capítulo II, FIG. 29). Estas observaciones sugieren la posibilidad de que el GABA pueda impactar en dichos receptores y regular la fisiología vascular. Una regulación similar a la que sugerimos en GP fue observada en la retina de rata, que como expusimos en la Introducción, compartiría gran parte del repertorio molecular con la GP. En retina el GABA tendría efectos complejos sobre el diámetro de las arteriolas y esto parecería depender en gran medida de la activación de los RGABA<sub>B</sub> en las células de Müller perivasculares [123]. Los autores comprueban esta actividad del GABA *in vitro*, sin embargo afirman que existe poca evidencia de que éste sea su rol fisiológico normal en la retina intacta. El rol vascular del GABA no cuenta con suficiente evidencia en sistemas fisiológicos reales y claramente representa un campo de estudio muy prometedor.

El GABA tendría un rol en el establecimiento y mantenimiento de una población de células progenitoras en la glándula pineal adulta

Todas aquellas células en el GP adulta que no poseen una morfología típica de pinealocito son consideradas intersticiales. El hecho de que la población celular GABAérgica pertenezca a este grupo, nos llevó a focalizarnos en el intersticio y a la caracterización fina del mismo. El grupo de células intersticiales es muy heterogéneo y gran parte de ellas expresan VIM, lo cual no es común en el tejido nervioso adulto. Un hallazgo muy interesante es que un gran número de estas células VIM<sup>+</sup> contenían al factor de transcripción Pax6 en sus núcleos y que su localización era mayoritariamente perivascular (ver Capítulo II, FIG. 24). La expresión de Pax6 está asociada a células inmaduras, de hecho en los primeros estadios embrionarios de la GP todas las células son Pax6<sup>+</sup> (ver Capítulo I, FIGS. 6 y 16) y NeuroD1<sup>+</sup>/VIM<sup>+</sup> [192]. Esto sugiere que las células que encontramos en la GP adulta podrían ser precursores que permanecen en el órgano maduro con el fin de renovar poblaciones celulares ante un determinado estímulo. Kofler y cols. [209] demostraron en GP adulta la presencia de una población celular que expresa nestina, una proteína de filamentos intermedios de células madres, y propusieron que representarían células indiferenciadas. Recientemente Gomez Esteban y cols. [243] describieron eventos de tipo neurogénico en la GP de vaca adulta, basados también en la expresión de nestina, VIM y el marcador de proliferación PCNA (del inglés *proliferating cell nuclear antigen*). Otro dato que cobra relevancia de las células Pax6<sup>+</sup>/VIM<sup>+</sup> mostradas en el Capítulo II, es su proximidad a vasos sanguíneos, pudiendo resultar un potencial “nicho vascular” de células progenitoras que encuentran un ambiente trófico favorable dentro de un tejido adulto [231]. La mayoría de las células intersticiales VIM<sup>+</sup>/Pax6<sup>+</sup> en la GP adulta expresan al RGABA<sub>B</sub>1, de hecho, este receptor solo fue localizado en este tipo celular y en la pared de vasos sanguíneos (ver Capítulo II, FIGS. 29 y 30). En realidad dichas células fueron observadas a partir del estadio P3 en la GP (ver Capítulo I, FIG. 18). Este hallazgo sugiere que la señalización del GABA mediada por su receptor metabotrópico podría tener un rol en el mantenimiento de ese linaje celular en particular, siendo las fibras o células GABAérgicas ubicadas en la proximidad las fuentes de GABA (ver Capítulo II, FIG. 25).

En base a nuestros resultados planteamos el modelo de la FIG. 48. En el primordio pineal se observa una expresión homogénea de Pax6 en todas las células que lo forman. Durante la etapa embrionaria el primordio crece y la población celular se vuelve progresivamente más heterogénea en cuanto a los niveles de Pax6 en sus núcleos. En

estadios postnatales las células continúan su diferenciación y la expresión de Pax6 se reduce progresivamente en la mayoría de ellas. Sin embargo, un grupo de células mantiene niveles elevados del factor de transcripción inclusive en la GP adulta. Una de las características que haría de esas células una subpoblación con un estado de diferenciación particular es la expresión progresiva del RGABA<sub>B</sub>1. En este contexto, la recepción GABAérgica mediada por RGABA<sub>B</sub> en la GP podría jugar un rol similar al que está documentado en la neurogénesis hipocampal adulta. Los receptores GABA en los precursores parcialmente indiferenciados de la GP adulta podría ser una característica que les permita mantenerse quiescente como ocurre con los neuroblastos del giro dentado [117].



**FIG. 48: Relación entre el RGABA<sub>B</sub>1 y células Pax6 positivas.**

En el esquema, el Pax6 nuclear está representado en color rojo cuya intensidad es indicativa del nivel de expresión. El RGABA<sub>B</sub>1 en la superficie celular está indicado en amarillo. La abundancia de los distintos estadios celulares representados es acorde al periodo descrito. Las flechas negras gruesas indican el sentido del proceso de diferenciación celular.

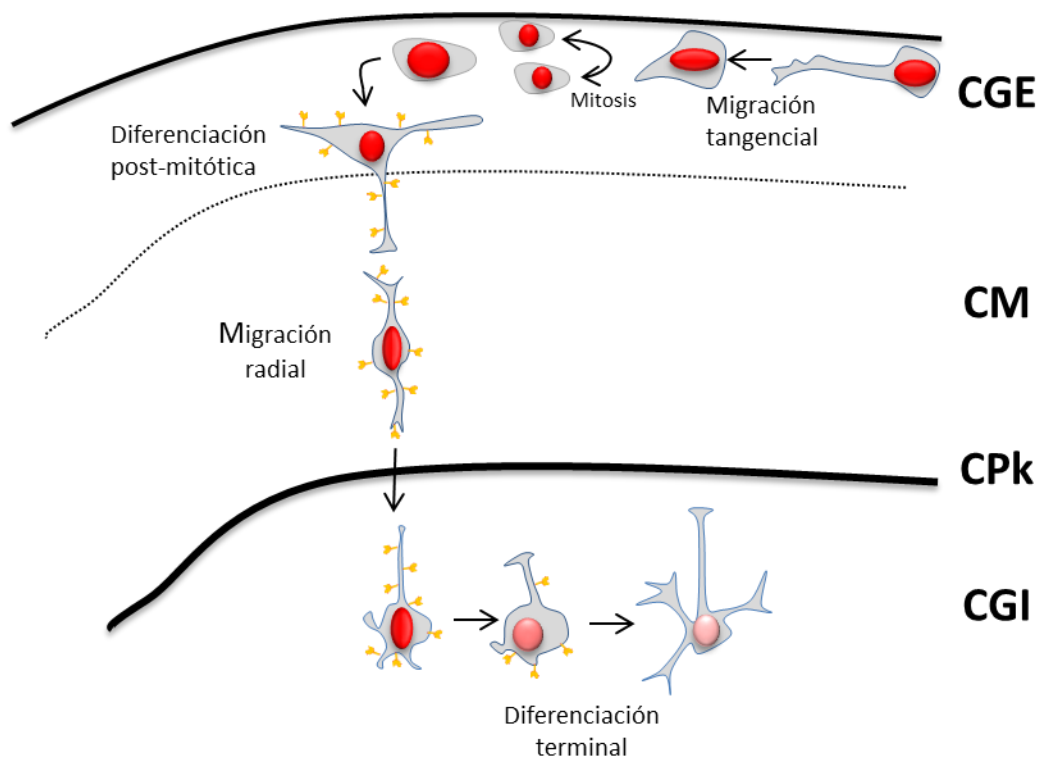
La doble inmunolocalización de Pax6 y RGABA<sub>B</sub>1 nos permitió apreciar la morfología tanto nuclear como citoplasmática de dicha subpoblación celular. La mayoría de las células presenta núcleos pequeños con su cromatina muy compacta y sin nucléolos visibles, mientras que sus citoplasmas se extienden en finas y largas proyecciones que suelen contactarse entre sí y con vasos sanguíneos próximos. En una baja proporción, también observamos células cuyos núcleos son Pax6 positivos pero la apariencia de la cromatina es más laxa; a su vez la localización del RGABA<sub>B</sub>1 parece ser más citoplasmática y difusa (ver Capítulo II, FIG. 30). En base a estas observaciones suponemos que dichas células podrían representar a aquellas que están en proceso de salir de su estado de relativa quiescencia para continuar su diferenciación hacia pinealocitos u otro tipo celular intersticial.

**RGABA<sub>B</sub>1 podría estar involucrado en el proceso de diferenciación de las células granulares del cerebelo**

Como mencionamos anteriormente, el cerebelo fue elegido como órgano control ya que expresa los componentes del sistema GABAérgico que intentamos identificar y localizar en la GP. No obstante, el análisis de la expresión de Pax6 y RGABA<sub>B</sub>1 en el cerebelo en desarrollo nos permitió ir más allá y generar una interesante hipótesis con respecto a la génesis de las neuronas granulares glutamatérgicas. Nuestros resultados sugieren que los precursores de las células granulares cerebelares expresan la subunidad metabotrópica en una ventana temporal definida durante el proceso de diferenciación. Estas observaciones están basadas en la disposición que muestra la RGABA<sub>B</sub>1 en este órgano que posee una organización estratificada lo cual facilita su interpretación (ver

Capítulo I, FIGS. 13 y 17). Las células granulares se originan en el labio rómbico y migran tangencialmente por la superficie del primordio cerebelar y se acumulan formando la CGE [203, 244, 245]. Esta capa puede ser dividida en al menos dos regiones, una más externa donde las células poseen mayor actividad mitótica y una más interna donde las células dejan de dividirse y comienzan el proceso de diferenciación. Komuro y cols. [246] describieron que dentro de la CGE las células post-mitóticas retardan la migración radial entre 20 y 48 hs, manteniéndose en la parte media e interna de esta capa. En esta etapa, los precursores granulares extienden un proceso orientado paralelo al eje longitudinal del *folium* y migran tangencialmente a velocidades variables según su ubicación relativa en la CGE. Después de este periodo de migración tangencial, las células cambian su morfología volviéndose más redondeadas, emiten una prolongación hacia la CM y comienzan la migración radial tornada sus somas ahusadas. El periodo de migración tangencial dentro de la CGE posiblemente le permite a las células tomar su ubicación correcta para comenzar su migración hacia la CGI. Los precursores de las células granulares migran radialmente asociadas a la glía de Bergman hacia el interior del órgano atravesando la CM y la CPk hasta ubicarse en la CGI [202].

Todas las células de la CGE expresan el factor de transcripción Pax6 y lo mantienen en un nivel elevado mientras migran y hasta que llegan a la CGI (ver Capítulo I, FIG. 6). Sin embargo, los niveles de Pax6 en las células de la CGI son heterogéneos y a medida que el desarrollo del cerebelo avanza, la expresión del factor de transcripción se reduce hasta niveles basales en las neuronas granulares adultas. Por su parte, la RGABA<sub>B</sub>1 comienza a evidenciarse en las células post-mitóticas de la capa más interna de la CGE y se mantiene durante la migración de las mismas hasta llegar a la CGI donde pierden su expresión gradualmente (ver Capítulo I, FIGS. 13 y 17). Si analizamos nuestras imágenes en relación a la descripción que hace Komuro y cols. [246], podríamos decir que la expresión de la RGABA<sub>B</sub>1 se iniciaría cuando las células post-mitóticas dejan de moverse tangencialmente y adquieren una forma celular más redondeada en la región más interna de la CGE. El proceso de diferenciación terminal de las neuronas granulares cerebelares tiene lugar en la CGI donde se produciría la pérdida progresiva de la expresión tanto de RGABA<sub>B</sub>1 como de Pax6. Este proceso se encuentra resumido en el siguiente esquema.



**FIG. 49: Relación entre el RGABA<sub>B1</sub> y Pax6 en la diferenciación de las células granulares cerebelares.**

Pax6 nuclear está representado en color rojo y la intensidad del color se relaciona con sus niveles de expresión. El RGABA<sub>B1</sub> en la superficie celular está representado en amarillo. Las flechas indican el sentido de la migración y diferenciación de las células granulares glutamatérgicas del cerebelo.

## NeuroD1 definiría el fenotipo glutamatérgico de los pinealocitos

La diferenciación GABAérgica y glutamatérgica está regulada por cascadas de factores de transcripción de la familia de los bHLH, entre otros mecanismos. Entre ellos se encuentra el NeuroD1, que según Roybon y cols. [196] sería capaz por sí solo de inhibir a Mash1 y suprimir el fenotipo GABAérgico en el desarrollo del cerebro anterior.

Los pinealocitos han sido clasificados como células glutamatérgicas [144, 247], lo cual coincide con la expresión temprana de Pax6 y NeuroD1 en el primordio pineal. NeuroD1 ha sido presentado por nuestro grupo como un elemento necesario pero no esencial en el establecimiento y mantenimiento del fenotipo de los pinealocitos; y su presencia modularía las repuestas oscilatorias dependientes de NA [192].

Al estudiar la dinámica de estos dos factores de transcripción durante todo el desarrollo de la GP, surge el interrogante sobre el origen de las células intersticiales GABAérgicas propias de la glándula.

Como mencionamos anteriormente, todas las células del primordio pineal expresan Pax6 y NeuroD1 en los estadios embrionarios analizados. Por lo tanto, existirían al menos dos posibilidades de génesis de las células intersticiales GABAérgicas: 1.- una extra-pineal por invasión celular desde otras regiones y/o estructuras ajenas al linaje principal; 2.- a partir de precursores que en algún momento expresaron Pax6 y NeuroD1 y por procesos de de-diferenciación y re-diferenciación dan origen a las células productoras de GABA.

## La expresión del gen *Gad1* podría ser inhibida directa o indirectamente por NeuroD1

En la GP de ratones KO totales para *NeuroD1* el gen que más aumentó su expresión fue *Gad1* [191]. Este resultado podría interpretarse como que ante la ausencia del bHLH, el fenotipo GABAérgico se vería favorecido. Por su parte, en otra línea de ratones KO pero condicionales no se observó dicha sobre-expresión. La diferencia entre ambos modelos podría atribuirse a los diferentes genotipos y/o a la delección relativamente tardía del gen *NeuroD1* en la GP Cre/LoxP, que se produce al activarse el promotor *Crx*. Esto último, podría permitir la diferenciación temprana del fenotipo glutamatérgico de los pinealocitos.

Apoyando la hipótesis del rol tipo bisagra del NeuroD1 entre los fenotipos glutamatérgico y GABAérgico, nosotros encontramos que en la retina de ratón P0, no hay superposición entre los dominios de expresión del NeuroD1 y de dos marcadores GABAérgicos analizados, *Gad1* y *Viaat* (ver Capítulo III, FIG. 45).

Además, nuestro grupo de trabajo recientemente mostró que el NeuroD1 está presente no solo en pinealocitos sino también en una subpoblación de células intersticiales [192]. Mientras la naturaleza del bHLH es oscilatoria en cuanto a su distribución subcelular en los primeros, en el intersticio se identificaron células con el NeuroD1 en sus núcleos o en sus citoplasmas, aparentemente independientes de la descarga nocturna de NA.

En cuanto a la caracterización de las células GABAérgicas propias de la GP, nuestros resultados concuerdan con la bibliografía. Schon y cols. [134] postularon que la internalización y la síntesis de GABA se produciría exclusivamente en los gliocitos. Echigo y Moriyama [143] localizaron al potencial marcador GABAérgico VIAAT en una subpoblación de astrocitos GFAP positivos y en una subpoblación que expresa el marcador de microglía OX42 pero no en pinealocitos. En el caso de las células que co-expresan el marcador GABAérgico y el microglial mostradas por dichos autores, deberíamos tener en cuenta nuestros resultados con Iba1 del Capítulo II, FIGS. 28 y 36, donde revelamos que la microglía presenta marca para las moléculas GABAérgicas, pero se lo atribuimos a compartimientos fagocíticos dentro de sus citoplasmas.

En cuanto a los factores de transcripción que podrían estar involucrados en la diferenciación de estas poblaciones GABAérgicas encontramos datos bibliográficos que involucrarían a Egr1 e Id-1. El primero fue indicado por Luo y cols. [212] como capaz de activar el promotor del gen *Gad1* en neuronas hipocampales embrionarias. En cuanto a la relación entre estos factores de transcripción, Passiatore y cols. [214] demostraron que Egr1 interacciona con el sitio promotor de *Id-1* e induce su expresión. Las proteínas Id, 1 y 2, inhiben la función transcripcional del NeuroD1 por disrupción del heterodímero activo con las proteínas E [248, 249]

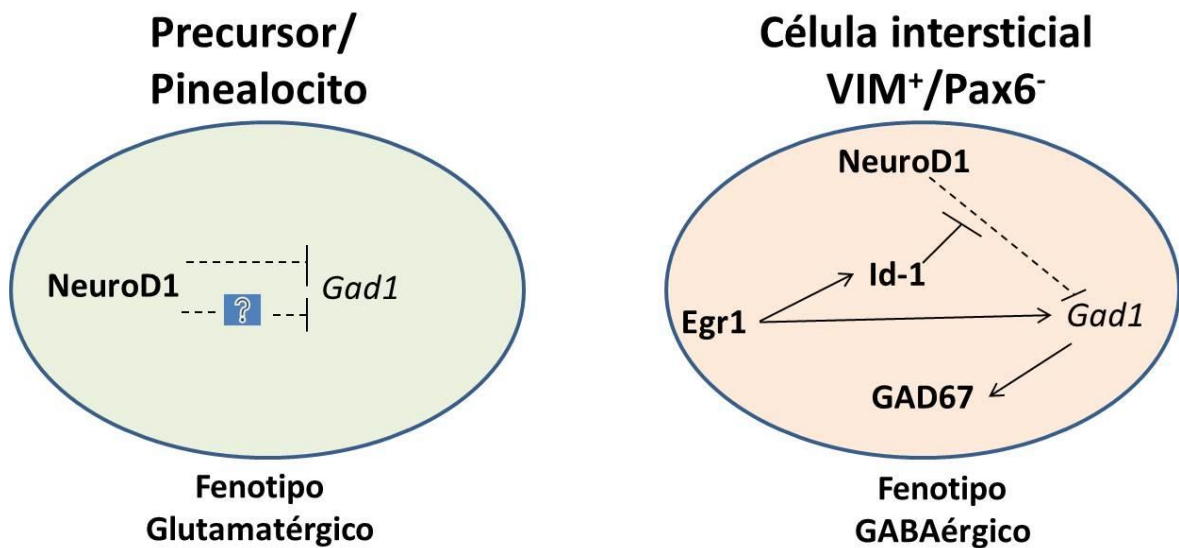
En la GP adulta, Kofler y cols. [209] demostraron la presencia del factor inhibitorio Id-1 en el citoplasma de una subpoblación de células VIM/S100 $\beta$  positivas y GFAP/OX42 negativas. El mismo grupo de investigación [211] también analizó la distribución del factor de transcripción Egr1 y encontraron su expresión en una subpoblación de células con morfología de glía que expresan VIM y S-100 $\beta$  (aproximadamente el 6% del total de células de la glándula pineal). Sin embargo, cuando analizaron su relación con la población de células Id-1<sup>+</sup>/VIM<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> descritas anteriormente, encuentran que solo una pequeña



parte expresa a Egr1 (3 de cada 8 células Id-1<sup>+</sup> cuantificadas). En el mismo trabajo los autores demuestran una gran población de células que expresan nestina, pero no Egr1; este resultado sería similar al que presentamos en el Capítulo II, FIG. 25, donde mostramos que las células Pax6<sup>+</sup> (posibles células precursoras) no expresan GAD67 por lo que no pertenecerían a la población GABAérgica descrita por nosotros.

En base a los datos mencionados y nuestros resultados, generamos un modelo de los factores de diferenciación que podrían estar involucrados en el desarrollo del fenotipo GABAérgico en una subpoblación de células intersticiales de la GP (FIG. 50).

Nosotros planteamos que la población de precursores de pinealocitos y las células parenquimales maduras contienen NeuroD1 en sus núcleos lo que inhibe directa o indirectamente al gen *Gad1* y por lo tanto presentarían un fenotipo glutamatérgico. En una subpoblación de células intersticiales, Egr1 induciría por un lado la expresión de Id-1 que inactiva al NeuroD1 favoreciendo su localización citoplasmática, y por el otro activaría la transcripción de *Gad1* que se expresaría y le conferiría capacidad GABAérgica a las mismas. En vista que esta hipótesis no plantea la ausencia de NeuroD1 sino la inhibición de su entrada al núcleo, la misma sería compatible con la idea de un origen común para ambos fenotipos ya que no descartamos que los precursores Pax6<sup>+</sup>/NeuroD1<sup>+</sup> presentes en las GP embrionaria den origen a las células GABAérgicas propias de la GP.



**FIG. 50: Factores de diferenciación involucrados en la definición de fenotipos glutamatérgico y GABAérgico en la glándula pineal.**

Esquema: el óvalo verde representa el contexto de un precursor o un pinealocito maduro donde el NeuroD1 mantiene suprimida la expresión de *Gad1* de forma directa o indirecta. El óvalo naranja representa el contexto de una célula intersticial GABAérgica que expresa *Egr1*, el cual induce la expresión de *Id-1*. Éste inhibe la funcionalidad de NeuroD1 por lo que reprime la inhibición del bHLH sobre *Gad1*. A su vez la expresión de *Gad1* y por ende de *GAD67*, es directamente inducida por *Egr1* lo que le confiere a estas células capacidad GABAérgica.

**El GABA modularía la actividad de las fibras nerviosas tanto simpáticas como GABAérgicas y la síntesis de melatonina mediante los RGABA<sub>A</sub>**

La localización de la RGABA<sub>A</sub>α1 en fibras TH<sup>+</sup> y GAD67<sup>+</sup> (Capítulo II, FIGS. 32 y 33) sugiere que el GABA podría estar regulando de manera pre-sináptica su propia liberación y la de NA. Rosenstein y cols. [141] encontraron en ensayos *in vitro* de GP de corto plazo que el GABA reducía la liberación de NA por parte de las fibras simpáticas remanentes. Nuestros resultados aportan evidencia de que la subunidad α1 del receptor ionotrópico podría estar involucrada en esa función propuesta para el GABA. Además notamos que dicha subunidad no está presente en toda la extensión de las fibras, lo que sugiere una localización y funcionalidad regionalizada de la misma. Por su parte, la presencia de la RGABA<sub>A</sub>α1 en las fibras GAD67<sup>+</sup> sugiere que el GABA liberado podría actuar de manera autocrina modulando su propia liberación u otro aspecto de la fisiología del terminal nervioso. Nosotros no observamos a la RGABA<sub>A</sub>α1 en membranas celulares en la GP, pero este resultado no descarta la presencia de RGABA<sub>A</sub> en pinealocitos o células intersticiales para lo cual será necesario estudiar las múltiples subunidades que se combinan bajo la forma del receptor pentamérico [91].

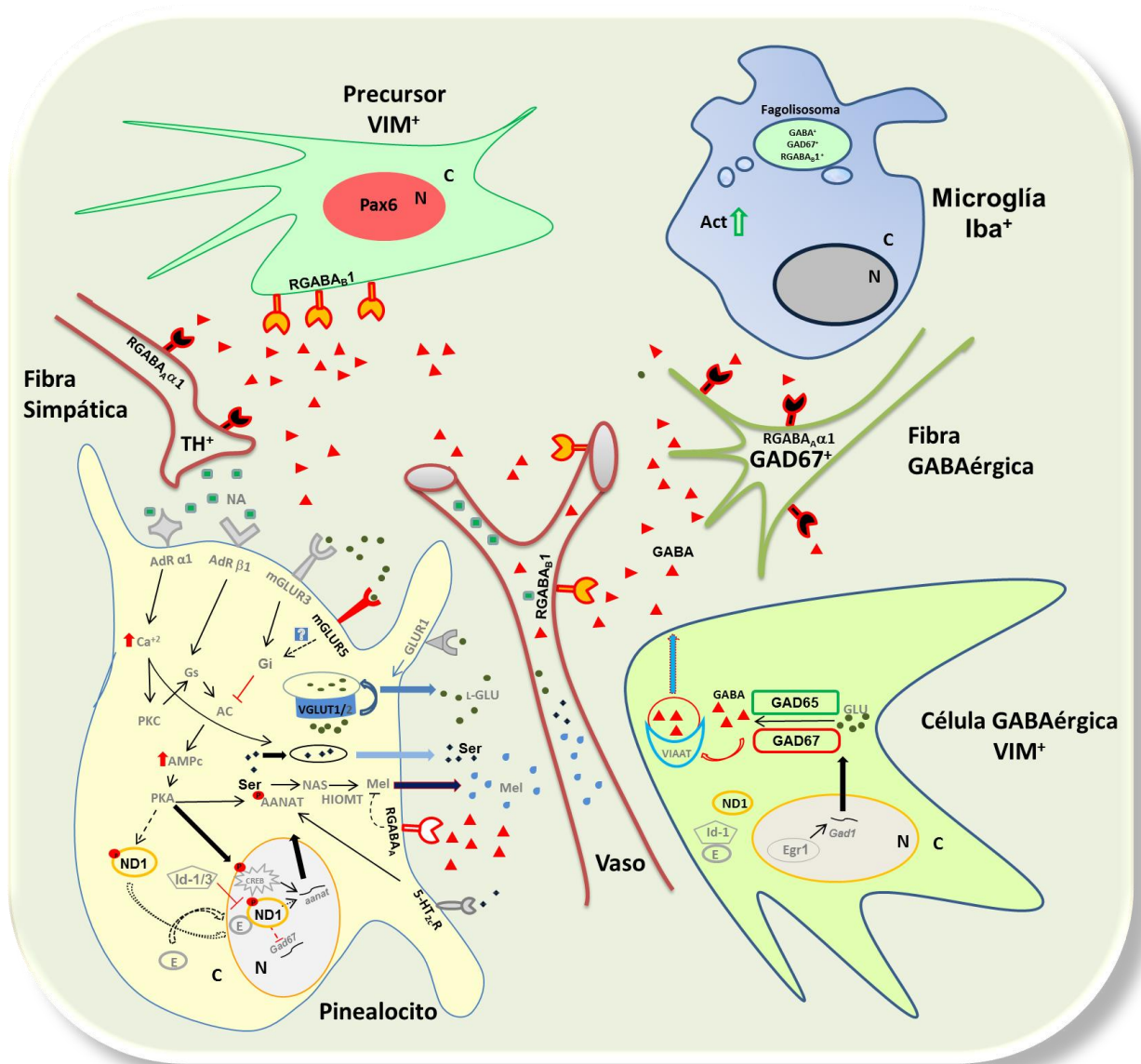
Por otro lado, nuestros experimentos farmacológicos realizados tanto *in vivo* como *in vitro* sugieren que los receptores ionotrópicos RGABA<sub>A</sub> están involucrados en la modulación de la producción de melatonina inducida por NA (Capítulo IV, FIGS. 46 y 47). Los efectos observados *in vitro* en principio reflejarían una acción del GABA del tipo post-sináptica, directa sobre la/s población/es celular/es y no de naturaleza pre-sináptica sobre

las fibras nerviosas, ya que el tipo de cultivo a largo plazo utilizado carecería de inervación funcional. Estos resultados sugieren la presencia de receptores ionotrópicos en algunas de las poblaciones celulares de la GP. De hecho la localización de los RGABA<sub>A</sub> en pinealocitos explicaría los resultados obtenidos tanto en la presente Tesis como en la bibliografía.

Los datos generados en los ensayos donde se utilizaron sólo las drogas GABAérgicas sin estimulación con NA, sugieren que el GABA por sí mismo tendría un rol modulador, ya sea sobre la serotonina y/o la melatonina. En los cultivos a largo plazo podríamos descartar la presencia de NA endógena, por lo que la caída del nivel de serotonina se debería exclusivamente a la activación de los RGABA<sub>A</sub> por parte del muscimol, y el hecho que este resultado se repitió en un ensayo *in vivo* resulta interesante. La actividad del GABA en este caso parecería aumentar la síntesis de melatonina ya que la concentración de su precursor se redujo. Sin embargo, si el GABA actuara a nivel de la síntesis y/o liberación de la serotonina, veríamos el mismo resultado. Estudios más finos de la cinética farmacológica de los RGABA<sub>A</sub> y de los niveles de serotonina y/o melatonina seguramente ayudarían a definir la funcionalidad de dicho transmisor en la GP.

## Distribución de los componentes del sistema GABAérgico en la pineal adulta.

Los datos reunidos hasta el momento junto con antecedentes bibliográficos nos permitieron generar un modelo de distribución y posibles funciones de los sistemas GABAérgico y glutamatérgico en la GP (FIG. 51 y Tabla 5). Las moléculas analizadas en este trabajo de Tesis aparecen escritas en color negro, mientras que las de datos bibliográficos están en gris. El modelo representa los linajes celulares que pudimos caracterizar mediante marcadores específicos y la relación que encontramos con los diferentes componentes de los sistemas GABAérgico y glutamatérgico estudiados. La representación también incluye a la vasculatura y a la inervación ya que ambas podrían ser susceptibles a la regulación por GABA.



**FIG. 51: Modelo de distribución celular y potenciales funciones de los sistemas GABAérgico y glutamatérgico en la GP adulta.**

En el esquema se han representado al pinealocito glutamatérgico, a la célula intersticial GABAérgica, al precursor Pax6<sup>+</sup>, a la microglía, un vaso sanguíneo y la inervación simpática y GABAérgica. Cabe aclarar que la figura no muestra la proporción real de los diferentes tipos celulares. Los pinealocitos representarían la mayor fuente de glutamato en la GP, mientras que el GABA parecería ser mayormente de origen nervioso y circulatorio, esto por el escaso número de células GABAérgicas observado. Por su parte, el GABA tendría influencia sobre la inervación GABAérgica y simpática mediante receptores ionotrópicos conformados, entre otras subunidades, por la RGABA<sub>A</sub>α1 (receptor negro con bordes rojos), y sobre la población de precursores Pax6<sup>+</sup> mediante receptores metabotrópicos (receptor amarillo con bordes rojos). Los vasos sanguíneos también estarían sujetos a una regulación GABAérgica mediante los RGABA<sub>B</sub>1. En el modelo se encuentra también representada la posible función inhibitoria del GABA sobre la síntesis de melatonina inducida por NA (sugerida por los experimentos *in vivo* e *in vitro* con drogas GABAérgicas) donde estarían involucrados RGABA<sub>A</sub> conformados por subunidades distintas a la α1 (receptor blanco con bordes rojos). En la célula GABAérgica el NeuroD1 (ND1) se mantendría a nivel citoplasmático ya que las proteínas E serían secuestradas por Id-1, mientras que en el pinealocito el bHLH oscila entre el compartimiento nuclear y citoplasmático en función del estímulo noradrenérgico. La microglía participaría en la remoción de restos de fibras nerviosas y células GABAérgicas. C: citoplasma. N: núcleo.

**Tabla 5:**

<b>Síntesis de los datos incluidos en la Fig. 51 que han sido generados en el presente trabajo de Tesis.</b>		
Nomenclatura	Función	Localización
GAD67/65	Enzimas biosintéticas de GABA	a) Citoplasma de células intersticiales VIM <sup>+</sup> . b) Interior de fibras nerviosas GABAérgicas.
GABA	Transmisor	Citoplasma de células GABAérgicas.
RGABA <sub>B</sub> 1	Subunidad B1 del Receptor GABA metabotrópico	a) Citoplasma y membrana de células intersticiales Pax6 <sup>+</sup> /VIM <sup>+</sup> . b) Paredes de vasos sanguíneos.
RGABA <sub>A</sub> α1	Subunidad α1 del Receptor GABA ionotrópico	Fibras nerviosas GABAérgicas y simpáticas.
RGABA <sub>A</sub>	Receptor GABA ionotrópico	Pinealocitos: localización sugerida por experimentos funcionales <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .

VGLUT1	Transportador de glutamato	Citoplasma de una subpoblación de pinealocitos.
mGluR5	Receptor metabotrópico de glutamato	Subpoblación de células intersticiales y pinealocitos.
Actina	Componente del citoesqueleto	Expresión incrementada en microglía.
Pax6	Factor de transcripción esencial en el desarrollo de la glándula pineal y el fenotipo glutamatérgico	Núcleos con niveles variables de Pax6 en una subpoblación de células intersticiales VIM <sup>+</sup> con ubicación perivascular.
NeuroD1	Factor de transcripción involucrado en el desarrollo de la glándula pineal y el fenotipo glutamatérgico	a) Pinealocitos, en los que fluctúa entre citoplasma y núcleo dependiendo de la presencia o no de NA. b) Citoplasma de una subpoblación de células GABAérgicas.
TH	Enzima tirosina hidroxilasa asociada a la síntesis de catecolaminas	a) Fibras nerviosas simpáticas. b) Posibles neuronas catecolaminérgicas.
<b>Elementos de la Fig. 51 extraídos de citas bibliográficas.</b>		
Egr1 [211-214]	Factor de transcripción asociado a la diferenciación GABAérgica e implicado en el intersticio de la GP	Núcleos de una subpoblación de células VIM <sup>+</sup> y S-100β <sup>+</sup> con morfología glial.
Id-1 [209 y 210]	Dominante negativo de los bHLH implicado en la regulación circadiana de la GP	Localización citoplasmática en una subpoblación de células VIM <sup>+</sup> /S-100β <sup>+</sup> y GFAP <sup>+</sup> /OX42 <sup>+</sup>
E [195]	Proteína ubicua que dimeriza con los b-HLH regulando sus funciones transcripcionales	No se demostró su presencia en GP. Se especula estaría localizada en pinealocitos y células intersticiales, interactuando con ND1 e Ids.
VIAAT [143]	Transportador de GABA y glicina	Subpoblación de astrocitos GFAP <sup>+</sup> y en una subpoblación de microglía OX42 <sup>+</sup> .
GluR1 [159]	Receptor ionotrópico de glutamato 1	Pinealocitos: su activación induciría la apertura de canales de Ca <sup>+2</sup> de tipo L y la exocitosis de microvesículas cargadas de L-glutamato.
mGluR3 [157]	Receptor metabotrópico de glutamato 3 asociado a proteínas Gi	Pinealocitos.
mGluR5 [158]	Receptor metabotrópico de glutamato 5 asociado a proteínas Gi	Se comprobó su actividad en cultivos de pinealocitos.
5-HT <sub>2c</sub> R [240-241]	Receptor de serotonina 2c	Pinealocitos, sugerido en experimentos funcionales potenciando la síntesis de melatonina inducida por NA.

# **CONCLUSIONES**

En el presente trabajo de Tesis se buscó abordar al sistema GABAérgico de la GP a distintos niveles, desde los periodos embrionario y neonatal hasta su rol en el adulto. En base a los resultados expuestos en las secciones anteriores podemos realizar una serie de observaciones novedosas que podrían aportar valiosos datos para el avance en el conocimiento de este sistema:

- a) **La fuente de GABA en los estadios embrionarios de la GP es de naturaleza nerviosa a partir de fibras GAD67 positivas, ya que no se encontraron células con capacidad biosintética propias del órgano.**
- b) **En los tejidos circundantes a la GP embrionaria, la expresión de Pax6 y la del receptor RGABA<sub>B</sub>1 definen dominios celulares distintivos y un efecto de gradiente particular en sus límites.**
- c) **En la ontogenia de las células granulares glutamatérgicas del cerebelo, la expresión de la subunidad RGABA<sub>B</sub>1 se produce en una ventana temporal definida, que se extiende desde la etapa post-mitótica en la CGE interna hasta el inicio de la diferenciación terminal en la CGI.**
- d) **Las células GABAérgicas de la glándula GP están representadas por una subpoblación de células intersticiales perivasculares que poseen VIM en sus citoplasmas y que no contienen ni Pax6 ni NeuroD1 en sus núcleos.**
- e) **La proporción de la subpoblación celular GABAérgica es baja, menos del 5% de las células que conforman la GP adulta.**
- f) **El GABA proveniente tanto la inervación como de las células GABAérgicas podrían modular la fisiología de los vasos sanguíneos en la glándula pineal adulta.**
- g) **La subunidad  $\alpha$ 1 de los RGABA<sub>A</sub> se localiza en regiones discretas de las fibras nerviosas tanto simpáticas como GABAérgicas. Esta observación apoya la hipótesis de una función pre-sináptica del GABA postulada desde la década de los noventa.**



- h) En la glándula pineal adulta identificamos una subpoblación perivascular de células  $VIM^+/Pax6^+/RGABA_B1^+$  que mantienen estrecho contacto tanto con fibras como con células GABAérgicas. Las primeras representarían precursores celulares parcialmente indiferenciados que se mantienen en el tejido adulto, siendo el GABA un modulador potencial de su estado quiescente.**
- i) Las células microgliales están relacionadas espacialmente con fibras y células GABAérgicas; se detectaron inclusiones irregulares dentro sus citoplasmas con marca para GAD67, GABA y  $RGABA_B1$ .**
- j) La actina posee un patrón característico en la microglía y podría utilizarse como una herramienta para evaluar su nivel de activación.**
- k) La inmunolocalización de la TH pone en evidencia una nueva población de neuronas catecolaminérgicas en la GP.**
- l) Los pinealocitos expresan VGLUT1 por lo que tienen capacidad glutamatérgica, lo cual es coherente con la presencia de Pax6 y NeuroD1 en sus núcleos durante la primera parte o toda la ontogenia de la glándula, respectivamente.**
- m) El receptor mGLUR5 está presente en las membranas de subpoblaciones de pinealocitos y de células intersticiales, lo que sugiere una influencia generalizada del glutamato.**
- n) En base a las observaciones en la GP y en cerebelo, es posible que el arresto de NeuroD1 en el compartimiento citoplasmático sea requerido para la diferenciación GABAérgica.**
- o) La manipulación farmacológica *in vivo* e *in vitro* del sistema GABAérgico, específicamente de los receptores ionotrópicos  $GABA_A$ , afectó los niveles locales de serotonina en la glándula pineal, sugiriendo un efecto**

sobre la síntesis y secreción de melatonina y/o serotonina. Los resultados obtenidos muestran una modulación negativa del GABA sobre la síntesis del indol inducida por NA y que dicho efecto sería mediado por los  $RGABA_A$  en las células propias de la glándula pineal.

## *Proyecciones futuras*

El presente trabajo de Tesis deja abierta una serie de interrogantes y líneas de investigación prometedoras. A continuación se enumeran los posibles lineamientos a seguir y los aspectos a profundizar para lograr una mejor comprensión del sistema analizado.

1. Realizar un barrido a nivel de los ARN mensajeros y de las proteínas de las subunidades de receptores GABA en la ontogenia de la GP.
2. Mediante manipulación farmacológica y marcadores de linajes celulares, buscaremos evaluar la capacidad de respuesta al GABA de la subpoblación de células Pax6<sup>+</sup>/RGABA<sub>B</sub>1<sup>+</sup> en condiciones fisiológicas, en modelos de lesión (GCSx, por ejemplo) y en cultivos organotípicos o de células dispersas.
3. Analizar la interconexión entre los sistemas GABAérgico y glutamatérgico sobre la fisiología pineal en modelos *in vitro* de corto y largo plazo mediante el uso de drogas específicas.
4. Manipular *in vivo* e *in vitro* a los genes *NeuroD1* y *Pax6* con el fin de evaluar las consecuencias sobre los fenotipos glutamatérgico y GABAérgico.
5. Estudiar la participación de los RGABA<sub>B</sub> en la ontogenia cerebelar y sus implicancias en patologías.

## REFERENCIAS

1. STEHLE JH, VON GALL C , KORF HW Melatonin: a clock-output, a clock-input. *J Neuroendocrinol* 2003; **15**:383-9.
2. TRIVEDI AK , KUMAR V Melatonin: an internal signal for daily and seasonal timing. *Indian J Exp Biol* 2014; **52**:425-37.
3. SUGDEN D Melatonin analogues induce pigment granule condensation in isolated *Xenopus laevis* melanophores in tissue culture. *J Endocrinol* 1989; **120**:R1-3.
4. TOSINI G, OWINO S, GUILLAUME JL et al. Understanding melatonin receptor pharmacology: latest insights from mouse models, and their relevance to human disease. *Bioessays* 2014; **36**:778-87.
5. DUBOCOVICH ML Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci* 1995; **16**:50-6.
6. REPERT SM, WEAVER DR, CASSONE VM et al. Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron* 1995; **15**:1003-15.
7. LI DY, SMITH DG, HARDELAND R et al. Melatonin receptor genes in vertebrates. *Int J Mol Sci* 2013; **14**:11208-23.
8. GALANO A, TAN DX , REITER RJ On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res* 2013; **54**:245-57.
9. HARDELAND R Chronobiology of Melatonin beyond the Feedback to the Suprachiasmatic Nucleus-Consequences to Melatonin Dysfunction. *Int J Mol Sci* 2013; **14**:5817-41.
10. TOMA C, ROSSI M, SOUSA I et al. Is ASMT a susceptibility gene for autism spectrum disorders? A replication study in European populations. *Mol Psychiatry* 2007; **12**:977-9.
11. JONSSON L, LJUNGGREN E, BREMER A et al. Mutation screening of melatonin-related genes in patients with autism spectrum disorders. *BMC Med Genomics* 2010; **3**:10.
12. CHASTE P, CLEMENT N, BOTROS HG et al. Genetic variations of the melatonin pathway in patients with attention-deficit and hyperactivity disorders. *J Pineal Res* 2011; **51**:394-9.
13. PARK HJ, PARK JK, KIM SK et al. Association of polymorphism in the promoter of the melatonin receptor 1A gene with schizophrenia and with insomnia symptoms in schizophrenia patients. *J Mol Neurosci* 2011; **45**:304-8.
14. SORIA V, MARTINEZ-AMOROS E, ESCARAMIS G et al. Resequencing and association analysis of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) gene and its contribution to major depression susceptibility. *J Pineal Res* 2010; **49**:35-44.
15. ROSENTHAL NE, SACK DA, GILLIN JC et al. Seasonal affective disorder. A description of the syndrome and preliminary findings with light therapy. *Arch Gen Psychiatry* 1984; **41**:72-80.
16. ZISAPEL N Sleep and sleep disturbances: biological basis and clinical implications. *Cell Mol Life Sci* 2007; **64**:1174-86.
17. MELKE J, GOUBRAN BOTROS H, CHASTE P et al. Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry* 2008; **13**:90-8.
18. TORDJMAN S, NAJJAR I, BELLISSANT E et al. Advances in the research of melatonin in autism spectrum disorders: literature review and new perspectives. *Int J Mol Sci* 2013; **14**:20508-42.

19. GAMBLE KL, BERRY R, FRANK SJ et al. Circadian clock control of endocrine factors. *Nat Rev Endocrinol* 2014; **10**:466-75.
20. KALSBECK A, CUTRERA RA, VAN HEERIKHUIZE JJ et al. GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat. *Neuroscience* 1999; **91**:453-61.
21. KALSBECK A, GARIDOU ML, PALM IF et al. Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci* 2000; **12**:3146-54.
22. MOLLER M , BAERES FM The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res* 2002; **309**:139-50.
23. RACZ B, HORVATH G, FALUHELYI N et al. Effects of PACAP on the circadian changes of signaling pathways in chicken pinealocytes. *J Mol Neurosci* 2008; **36**:220-6.
24. MOLLER M , BAERES FM PACAP-containing intrapineal nerve fibers originate predominantly in the trigeminal ganglion: a combined retrograde tracing- and immunohistochemical study of the rat. *Brain Res* 2003; **984**:160-9.
25. BUIJS RM , PEVET P Vasopressin- and oxytocin-containing fibres in the pineal gland and subcommissural organ of the rat. *Cell Tissue Res* 1980; **205**:11-7.
26. MIKKELSEN JD, HAUSER F, DELECEA L et al. Hypocretin (orexin) in the rat pineal gland: a central transmitter with effects on noradrenaline-induced release of melatonin. *Eur J Neurosci* 2001; **14**:419-25.
27. MOLLER M, REUSS S, OLCESE J et al. Central neural control of pineal melatonin synthesis in the rat. *Experientia* 1987; **43**:186-8.
28. SAKAI Y, HIRA Y , MATSUSHIMA S Central GABAergic innervation of the mammalian pineal gland: a light and electron microscopic immunocytochemical investigation in rodent and nonrodent species. *J Comp Neurol* 2001; **430**:72-84.
29. KLEIN DC, VOISIN P , NAMBOODIRI MA The pineal family of aromatic amine N-acetyltransferases. *Bioessays* 1985; **3**:217-20.
30. VANECEK J, SUGDEN D, WELLER J et al. Atypical synergistic alpha 1- and beta-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology* 1985; **116**:2167-73.
31. STEHLE JF, NS; MOLINA, CA; SIMONNEAUX, V; PEVET, P; SASSONE-CORSI, P Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 1993; **365**:314-320.
32. MARONDE E, PFEFFER M, VON GALL C et al. Signal transduction in the rodent pineal organ. From the membrane to the nucleus. *Adv Exp Med Biol* 1999; **460**:109-31.
33. PFEFFER M, KUHN R, KRUG L et al. Rhythmic variation in beta1-adrenergic receptor mRNA levels in the rat pineal gland: circadian and developmental regulation. *Eur J Neurosci* 1998; **10**:2896-904.
34. HAGIWARA M, BRINDLE P, HAROOTUNIAN A et al. Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol* 1993; **13**:4852-9.
35. ROSEBOOM PH, COON SL, BALER R et al. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 1996; **137**:3033-45.
36. EBIHARA S, MARKS T, HUDSON DJ et al. Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science* 1986; **231**:491-3.

37. ROSEBOOM PH, NAMBOODIRI MA, ZIMONJIC DB et al. Natural melatonin 'knockdown' in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; **63**:189-97.
38. VIVIEN-ROELS B, MALAN A, RETTORI MC et al. Daily variations in pineal melatonin concentrations in inbred and outbred mice. *J Biol Rhythms* 1998; **13**:403-9.
39. GASTEL JA, ROSEBOOM PH, RINALDI PA et al. Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 1998; **279**:1358-60.
40. STEHLE JH, VON GALL C, SCHOMERUS C et al. Of rodents and ungulates and melatonin: creating a uniform code for darkness by different signaling mechanisms. *J Biol Rhythms* 2001; **16**:312-25.
41. SIMONNEAUX V , RIBELAYGA C Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 2003; **55**:325-95.
42. TERRIFF DL, CHIK CL, PRICE DM et al. Proteasomal proteolysis in the adrenergic induction of arylalkylamine-N-acetyltransferase in rat pinealocytes. *Endocrinology* 2005; **146**:4795-803.
43. BERG GR , KLEIN DC Norepinephrine increases the (32P)labelling of a specific phospholipid fraction of post-synaptic pineal membranes. *J Neurochem* 1972; **19**:2519-32.
44. HO AK, CHIK CL , KLEIN DC Effects of protein kinase inhibitor (1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H7) on protein kinase C activity and adrenergic stimulation of cAMP and cGMP in rat pinealocytes. *Biochem Pharmacol* 1988; **37**:1015-20.
45. SUGDEN AL, SUGDEN D , KLEIN DC Essential role of calcium influx in the adrenergic regulation of cAMP and cGMP in rat pinealocytes. *J Biol Chem* 1986; **261**:11608-12.
46. SUGDEN D , KLEIN DC Activators of protein kinase C act at a postreceptor site to amplify cyclic AMP production in rat pinealocytes. *J Neurochem* 1988; **50**:149-55.
47. KORF HW, SCHOMERUS C , STEHLE JH The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1998; **146**:1-100.
48. MARONDE E , STEHLE JH The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. *Trends Endocrinol Metab* 2007; **18**:142-9.
49. HO AK, PRICE DM, TERRIFF D et al. Timing of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in the rat pineal gland. *Mol Cell Endocrinol* 2006; **252**:34-9.
50. THAKUR MK, RATTAN, SURESH I.S. Brain Aging and Therapeutic Interventions. In, Springer Science+Business Media Dordrecht 2012.
51. OLIVIER B Serotonin: A never-ending story. *Eur J Pharmacol* 2015; **753**:2-18.
52. HUANG Z, LIU T, CHATTORAJ A et al. Posttranslational regulation of TPH1 is responsible for the nightly surge of 5-HT output in the rat pineal gland. *J Pineal Res* 2008; **45**:506-14.
53. AXELROD J , WEISSBACH H Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science* 1960; **131**:1312.
54. SUN X, DENG J, LIU T et al. Circadian 5-HT production regulated by adrenergic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**:4686-91.

55. MURAKAMI T, KIKUTA A, TAGUCHI T et al. The blood vascular architecture of the rat pineal gland: a scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Arch Histol Cytol* 1988; **51**:61-9.
56. ANDERSON E The Anatomy of Bovine and Ovine Pineals. Light and Electron Microscopic Studies. *J Ultrastruct Res* 1965; **28**:SUPPL 8:1-80.
57. WARTENBERG H The mammalian pineal organ: electron microscopic studies on the fine structure of pinealocytes, glial cells and on the perivascular compartment. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1968; **86**:74-97.
58. MOLLER M The ultrastructure of the human fetal pineal gland. I. Cell types and blood vessels. *Cell Tissue Res* 1974; **152**:13-30.
59. WELSH MG , REITER RJ The pineal gland of the gerbil, *Meriones unguiculatus*. I. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 1978; **193**:323-36.
60. MATSUSHIMA S , REITER RJ Ultrastructural observations at pineal gland capillaries in four rodent species. *Am J Anat* 1975; **143**:265-81.
61. MOLLER M, VAN DEURS B , WESTERGAARD E Vascular permeability to proteins and peptides in the mouse pineal gland. *Cell Tissue Res* 1978; **195**:1-15.
62. CHEN YL, CHEN WP, HUANG BN et al. Permeability of the pineal organ of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) to HRP with special reference to different types of blood capillaries. *Arch Histol Cytol* 1994; **57**:175-86.
63. KAUR C, SIVAKUMAR V, LU J et al. Increased vascular permeability and nitric oxide production in response to hypoxia in the pineal gland. *J Pineal Res* 2007; **42**:338-49.
64. FALCON J, BESSEAU L, FUENTES M et al. Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates. *Ann N Y Acad Sci* 2009; **1163**:101-11.
65. BAILEY MJ, COON SL, CARTER DA et al. Night/day changes in pineal expression of >600 genes: central role of adrenergic/cAMP signaling. *J Biol Chem* 2009; **284**:7606-22.
66. TOSINI G, CHAURASIA SS , MICHAEL IUVONE P Regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) in the retina. *Chronobiol Int* 2006; **23**:381-91.
67. KLEIN DC The 2004 Aschoff/Pittendrigh lecture: Theory of the origin of the pineal gland--a tale of conflict and resolution. *J Biol Rhythms* 2004; **19**:264-79.
68. KLEIN DC, BAILEY MJ, CARTER DA et al. Pineal function: impact of microarray analysis. *Mol Cell Endocrinol* 2010; **314**:170-83.
69. BEN-ARI Y The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: A personal journey. *Neuroscience* 2014; **279C**:187-219.
70. WALL MJ , USOWICZ MM Development of action potential-dependent and independent spontaneous GABAA receptor-mediated currents in granule cells of postnatal rat cerebellum. *Eur J Neurosci* 1997; **9**:533-48.
71. MARTINEZ-RODRIGUEZ R, TONDA A, GRAGERA RR et al. Synaptic and non-synaptic immunolocalization of GABA and glutamate acid decarboxylase (GAD) in cerebellar cortex of rat. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1993; **39**:115-23.
72. LIU QY, SCHAFFNER AE, CHANG YH et al. Persistent activation of GABA(A) receptor/Cl(-) channels by astrocyte-derived GABA in cultured embryonic rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 2000; **84**:1392-403.
73. ANGULO MC, LE MEUR K, KOZLOV AS et al. GABA, a forgotten gliotransmitter. *Prog Neurobiol* 2008; **86**:297-303.
74. FARRANT M , NUSSER Z Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 2005; **6**:215-29.

75. ERLANDER MG , TOBIN AJ The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem Res* 1991; **16**:215-26.
76. BU DF, ERLANDER MG, HITZ BC et al. Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**:2115-9.
77. DIRKX R, JR., THOMAS A, LI L et al. Targeting of the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase to intracellular organelles is mediated by its interaction with the NH<sub>2</sub>-terminal region of the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *J Biol Chem* 1995; **270**:2241-6.
78. KANAANI J, LISSIN D, KASH SF et al. The hydrophilic isoform of glutamate decarboxylase, GAD67, is targeted to membranes and nerve terminals independent of dimerization with the hydrophobic membrane-anchored isoform, GAD65. *J Biol Chem* 1999; **274**:37200-9.
79. SCHOUSBOE A Pharmacological and functional characterization of astrocytic GABA transport: a short review. *Neurochem Res* 2000; **25**:1241-4.
80. CONTI F, MINELLI A , MELONE M GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; **45**:196-212.
81. KANNER BI Structure and function of sodium-coupled GABA and glutamate transporters. *J Membr Biol* 2006; **213**:89-100.
82. REDECKER P Immunoreactivity for multiple GABA transporters (GAT-1, GAT-2, GAT-3) in the gerbil pineal gland. *Neurosci Lett* 1999; **266**:117-20.
83. TILLAKARATNE NJ, MEDINA-KAUWE L , GIBSON KM gamma-Aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 1995; **112**:247-63.
84. SARUP A, LARSSON OM , SCHOUSBOE A GABA transporters and GABA-transaminase as drug targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2003; **2**:269-77.
85. MADSEN KK, LARSSON OM , SCHOUSBOE A Regulation of excitation by GABA neurotransmission: focus on metabolism and transport. *Results Probl Cell Differ* 2008; **44**:201-21.
86. BOWERY NG GABAB receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993; **33**:109-47.
87. CHEBIB M , JOHNSTON GA The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; **26**:937-40.
88. BOWERY NG, BETTLER B, FROESTL W et al. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* 2002; **54**:247-64.
89. MÖHLER SJEAH. THE GABA RECEPTORS, THIRD EDITION. In, Humana Press Inc., 2007.
90. SIMEONE TA, DONEVAN SD , RHO JM Molecular biology and ontogeny of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors in the mammalian central nervous system. *J Child Neurol* 2003; **18**:39-48; discussion 49.
91. OLSEN RW , SIEGHART W International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev* 2008; **60**:243-60.
92. SIEGHART W Allosteric modulation of GABA<sub>A</sub> receptors via multiple drug-binding sites. *Adv Pharmacol* 2015; **72**:53-96.



93. LOTURCO JJ, OWENS DF, HEATH MJ et al. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 1995; **15**:1287-98.
94. TOZUKA Y, FUKUDA S, NAMBA T et al. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 2005; **47**:803-15.
95. KAUPMANN K, HUGGEL K, HEID J et al. Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 1997; **386**:239-46.
96. KAUPMANN K, MALITSCHKEK B, SCHULER V et al. GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 1998; **396**:683-7.
97. CALVER AR, DAVIES CH , PANGALOS M GABA(B) receptors: from monogamy to promiscuity. *Neurosignals* 2002; **11**:299-314.
98. ROBBINS MJ, CALVER AR, FILIPPOV AK et al. GABA(B2) is essential for g-protein coupling of the GABA(B) receptor heterodimer. *J Neurosci* 2001; **21**:8043-52.
99. BEHAR TN, SMITH SV, KENNEDY RT et al. GABA(B) receptors mediate motility signals for migrating embryonic cortical cells. *Cereb Cortex* 2001; **11**:744-53.
100. DAVIS AM, HENION TR , TOBET SA Gamma-aminobutyric acidB receptors and the development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol* 2002; **449**:270-80.
101. SANDS SA, PURISAI MG, CHRONWALL BM et al. Ontogeny of GABA(B) receptor subunit expression and function in the rat spinal cord. *Brain Res* 2003; **972**:197-206.
102. BEN-ARI Y, GAIARSA JL, TYZIO R et al. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* 2007; **87**:1215-84.
103. BEN-ARI Y, KHAZIPOV R, LEINEKUGEL X et al. GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'. *Trends Neurosci* 1997; **20**:523-9.
104. LU J, KARADSHAH M , DELPIRE E Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *J Neurobiol* 1999; **39**:558-68.
105. RIVERA C, VOIPIO J, PAYNE JA et al. The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 1999; **397**:251-5.
106. RIVERA C, LI H, THOMAS-CRUSELLS J et al. BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl<sup>-</sup> extrusion. *J Cell Biol* 2002; **159**:747-52.
107. OWENS DF, BOYCE LH, DAVIS MB et al. Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 1996; **16**:6414-23.
108. LEINEKUGEL X, KHALILOV I, MCLEAN H et al. GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Adv Neurol* 1999; **79**:189-201.
109. LUDDENS H, KORPI ER , SEEBURG PH GABAA/benzodiazepine receptor heterogeneity: neurophysiological implications. *Neuropharmacology* 1995; **34**:245-54.
110. LAURIE DJ, WISDEN W , SEEBURG PH The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J Neurosci* 1992; **12**:4151-72.

111. WISDEN W, LAURIE DJ, MONYER H et al. The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci* 1992; **12**:1040-62.
112. FRITSCHY JM, PAYSAN J, ENNA A et al. Switch in the expression of rat GABAA-receptor subtypes during postnatal development: an immunohistochemical study. *J Neurosci* 1994; **14**:5302-24.
113. KASH SF, JOHNSON RS, TECOTT LH et al. Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**:14060-5.
114. ASADA H, KAWAMURA Y, MARUYAMA K et al. Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**:6496-9.
115. SUNG KW, KIRBY M, MCDONALD MP et al. Abnormal GABAA receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. *J Neurosci* 2000; **20**:7531-8.
116. PALLOTTO M, DEPREZ F Regulation of adult neurogenesis by GABAergic transmission: signaling beyond GABAA-receptors. *Front Cell Neurosci* 2014; **8**:166.
117. GIACHINO C, BARZ M, TCHORZ JS et al. GABA suppresses neurogenesis in the adult hippocampus through GABAB receptors. *Development* 2014; **141**:83-90.
118. MEIER SD, KAFITZ KW, ROSE CR Developmental profile and mechanisms of GABA-induced calcium signaling in hippocampal astrocytes. *Glia* 2008; **56**:1127-37.
119. EDVINSSON L, KRAUSE DN Pharmacological characterization of GABA receptors mediating vasodilation of cerebral arteries in vitro. *Brain Res* 1979; **173**:89-97.
120. FERNANDEZ-KLETT F, OFFENHAUSER N, DIRNAGL U et al. Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**:22290-5.
121. PEPPIATT CM, HOWARTH C, MOBBS P et al. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 2006; **443**:700-4.
122. KAMRAN M, BAHRAMI A, SOLTANI N et al. GABA-induced vasorelaxation mediated by nitric oxide and GABAA receptor in non diabetic and streptozotocin-induced diabetic rat vessels. *Gen Physiol Biophys* 2013; **32**:101-6.
123. HINDS K, MONAGHAN KP, FROLUND B et al. GABAergic control of arteriolar diameter in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; **54**:6798-805.
124. HALL CN, REYNELL C, GESSLEIN B et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* 2014; **508**:55-60.
125. KATO K, NAKAGAWA C, MURABAYASHI H et al. Expression and distribution of GABA and GABAB-receptor in the rat adrenal gland. *J Anat* 2014; **224**:207-15.
126. KRALL J, BALLE T, KROGSGAARD-LARSEN N et al. GABAA receptor partial agonists and antagonists: structure, binding mode, and pharmacology. *Adv Pharmacol* 2015; **72**:201-27.
127. JOHNSTON GA Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. *Br J Pharmacol* 2013; **169**:328-36.
128. JOHNSTON GA Muscimol as an ionotropic GABA receptor agonist. *Neurochem Res* 2014; **39**:1942-7.
129. BOWERY NG GABAB receptor: a site of therapeutic benefit. *Curr Opin Pharmacol* 2006; **6**:37-43.

130. FROESTL W Chemistry and pharmacology of GABAB receptor ligands. *Adv Pharmacol* 2010; **58**:19-62.
131. CEDILLO LN , MIRANDA F Effects of co-administration of the GABAB receptor agonist baclofen and a positive allosteric modulator of the GABAB receptor, CGP7930, on the development and expression of amphetamine-induced locomotor sensitization in rats. *Pharmacol Rep* 2013; **65**:1132-43.
132. YOUNG KA, FRANKLIN TR, ROBERTS DC et al. Nipping cue reactivity in the bud: baclofen prevents limbic activation elicited by subliminal drug cues. *J Neurosci* 2014; **34**:5038-43.
133. JOHNSTON GA, CHEBIB M, HANRAHAN JR et al. GABA(C) receptors as drug targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2003; **2**:260-8.
134. SCHON F, BEART PM, CHAPMAN D et al. On GABA metabolism in the gliocyte cells of the rat pineal gland. *Brain Res* 1975; **85**:479-90.
135. MATA MM, SCHRIER BK, KLEIN DC et al. On GABA function and physiology in the pineal gland. *Brain Res* 1976; **118**:383-94.
136. WANIEWSKI RA , SURIA A Alterations in gamma-aminobutyric acid content in the rat superior cervical ganglion and pineal gland. *Life Sci* 1977; **21**:1129-41.
137. EBADI M , CHAN A Characteristics of GABA Binding Sites in Bovine Pineal Gland. *Brain Res Bull* 1980; **Vol.5**:179-187.
138. EBADI M, CHAN A, HAMMAD H et al. Serotonin N-acetyltransferase and its regulation by pineal substances. *Prog Clin Biol Res* 1982; **92**:21-33.
139. BALEMANS MG, MANS D, SMITH I et al. The influence of GABA on the synthesis of N-acetylserotonin, melatonin, O-acetyl-5-hydroxytryptophol and O-acetyl-5-methoxytryptophol in the pineal gland of the male Wistar rat. *Reprod Nutr Dev* 1983; **23**:151-60.
140. ROSENSTEIN RE, CHULUYAN HE, PEREYRA EN et al. Release and effect of gamma-aminobutyric acid (GABA) on rat pineal melatonin production in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 1989; **9**:207-19.
141. ROSENSTEIN RE, CHULUYAN HE , CARDINALI DP Presynaptic effects of gamma-aminobutyric acid on norepinephrine release and uptake in rat pineal gland. *J Neural Transm Gen Sect* 1990; **82**:131-40.
142. ROSENSTEIN RE, CHULUYAN HE, DIAZ MC et al. GABA as a presumptive paracrine signal in the pineal gland. Evidence on an intrapineal GABAergic system. *Brain Res Bull* 1990; **25**:339-44.
143. ECHIGO N , MORIYAMA Y Vesicular inhibitory amino acid transporter is expressed in gamma-aminobutyric acid (GABA)-containing astrocytes in rat pineal glands. *Neurosci Lett* 2004; **367**:79-84.
144. MORIYAMA Y , YAMAMOTO A Microvesicles isolated from bovine pineal gland specifically accumulate L-glutamate. *FEBS Lett* 1995; **367**:233-6.
145. YATSUSHIRO S, YAMADA H, KOZAKI S et al. L-aspartate but not the D form is secreted through microvesicle-mediated exocytosis and is sequestered through Na<sup>+</sup>-dependent transporter in rat pinealocytes. *J Neurochem* 1997; **69**:340-7.
146. ISHIO S, YAMADA H, HAYASHI M et al. D-aspartate modulates melatonin synthesis in rat pinealocytes. *Neurosci Lett* 1998; **249**:143-6.
147. MORGANS CW Neurotransmitter release at ribbon synapses in the retina. *Immunol Cell Biol* 2000; **78**:442-6.
148. SPIWOKS-BECKER I, MAUS C, TOM DIECK S et al. Active zone proteins are dynamically associated with synaptic ribbons in rat pinealocytes. *Cell Tissue Res* 2008; **333**:185-95.

149. REUSS S Pineal ribbon synapses: regulated by the gland's central innervation. *Neuro Endocrinol Lett* 2010; **31**:761-5.
150. MORIMOTO R, HAYASHI M, YATSUSHIRO S et al. Co-expression of vesicular glutamate transporters (VGLUT1 and VGLUT2) and their association with synaptic-like microvesicles in rat pinealocytes. *J Neurochem* 2003; **84**:382-91.
151. YOSHIDA S, INA A, KONNO J et al. The ontogenic expressions of multiple vesicular glutamate transporters during postnatal development of rat pineal gland. *Neuroscience* 2008; **152**:407-16.
152. YOSHIDA S, HIRA Y, EHARA A et al. A rhythmic change of vesicular glutamate transporter (VGLUT) 2 expression in the rat pineal gland. *Neurosci Res* 2012; **72**:16-22.
153. NOGAMI H, OGASAWARA K, MIMURA Y et al. Developmentally-regulated expression of tissue-specific splice variant of rat vesicular glutamate transporter 1 in retina and pineal gland. *J Neurochem* 2006; **99**:142-53.
154. GOVITRAPONG P , EBADI M The inhibition of pineal arylalkylamine n-acetyltransferase by glutamic acid and its analogues. *Neurochem Int* 1988; **13**:223-30.
155. KUS L, HANDA RJ , MCNULTY JA Glutamate inhibition of the adrenergic-stimulated production of melatonin in rat pineal gland in vitro. *J Neurochem* 1994; **62**:2241-5.
156. YAMADA H, YAMAMOTO A, YODOZAWA S et al. Microvesicle-mediated exocytosis of glutamate is a novel paracrine-like chemical transduction mechanism and inhibits melatonin secretion in rat pinealocytes. *J Pineal Res* 1996; **21**:175-91.
157. YAMADA H, YATSUSHIRO S, ISHIO S et al. Metabotropic glutamate receptors negatively regulate melatonin synthesis in rat pinealocytes. *J Neurosci* 1998; **18**:2056-62.
158. YATSUSHIRO S, YAMADA H, HAYASHI M et al. Functional expression of metabotropic glutamate receptor type 5 in rat pinealocytes. *Neuroreport* 1999; **10**:1599-603.
159. YATSUSHIRO S, YAMADA H, HAYASHI M et al. Ionotropic glutamate receptors trigger microvesicle-mediated exocytosis of L-glutamate in rat pinealocytes. *J Neurochem* 2000; **75**:288-97.
160. MORIYAMA Y, HAYASHI M, YAMADA H et al. Synaptic-like microvesicles, synaptic vesicle counterparts in endocrine cells, are involved in a novel regulatory mechanism for the synthesis and secretion of hormones. *J Exp Biol* 2000; **203**:117-25.
161. RATH MF, ROHDE K, KLEIN DC et al. Homeobox genes in the rodent pineal gland: roles in development and phenotype maintenance. *Neurochem Res* 2013; **38**:1100-12.
162. ESTIVILL-TORRUS G, VITALIS T, FERNANDEZ-LLEBREZ P et al. The transcription factor Pax6 is required for development of the diencephalic dorsal midline secretory radial glia that form the subcommissural organ. *Mech Dev* 2001; **109**:215-24.
163. MITCHELL TN, FREE SL, WILLIAMSON KA et al. Polymicrogyria and absence of pineal gland due to PAX6 mutation. *Ann Neurol* 2003; **53**:658-63.
164. NISHIDA A, FURUKAWA A, KOIKE C et al. Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci* 2003; **6**:1255-63.

165. RATH MF, MUÑOZ E, GANGULY S et al. Expression of the Otx2 homeobox gene in the developing mammalian brain: embryonic and adult expression in the pineal gland. *J Neurochem* 2006; **97**:556-66.
166. YAMAZAKI F, MOLLER M, FU C et al. The Lhx9 homeobox gene controls pineal gland development and prevents postnatal hydrocephalus. *Brain Struct Funct* 2015; **220**:1497-509.
167. LI X, CHEN S, WANG Q et al. A pineal regulatory element (PIRE) mediates transactivation by the pineal/retina-specific transcription factor CRX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**:1876-81.
168. ROVSING L, CLOKIE S, BUSTOS DM et al. Crx broadly modulates the pineal transcriptome. *J Neurochem* 2011; **119**:262-74.
169. ROHDE K, ROVSING L, HO AK et al. Circadian dynamics of the cone-rod homeobox (CRX) transcription factor in the rat pineal gland and its role in regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT). *Endocrinology* 2014; **155**:2966-75.
170. FUKUHARA C, DIRDEN JC , TOSINI G Circadian expression of period 1, period 2, and arylalkylamine N-acetyltransferase mRNA in the rat pineal gland under different light conditions. *Neurosci Lett* 2000; **286**:167-70.
171. TAKEKIDA S, YAN L, MAYWOOD ES et al. Differential adrenergic regulation of the circadian expression of the clock genes Period1 and Period2 in the rat pineal gland. *Eur J Neurosci* 2000; **12**:4557-61.
172. MUÑOZ E, BREWER M , BALER R Circadian Transcription. Thinking outside the E-Box. *J Biol Chem* 2002; **277**:36009-17.
173. MUÑOZ E , BALER R The circadian E-box: when perfect is not good enough. *Chronobiol Int* 2003; **20**:371-88.
174. WONGCHITRAT P, FELDER-SCHMITTBUHL MP, GOVITRAPONG P et al. A noradrenergic sensitive endogenous clock is present in the rat pineal gland. *Neuroendocrinology* 2011; **94**:75-83.
175. GEHRING WJ The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. *Genes Cells* 1996; **1**:11-5.
176. WALTHER C , GRUSS P Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 1991; **113**:1435-49.
177. RATH MF, BAILEY MJ, KIM JS et al. Developmental and daily expression of the Pax4 and Pax6 homeobox genes in the rat retina: localization of Pax4 in photoreceptor cells. *J Neurochem* 2009; **108**:285-94.
178. DORSKY RI, CHANG WS, RAPAPORT DH et al. Regulation of neuronal diversity in the *Xenopus* retina by Delta signalling. *Nature* 1997; **385**:67-70.
179. HIRSCH N , HARRIS WA *Xenopus* Pax-6 and retinal development. *J Neurobiol* 1997; **32**:45-61.
180. JOHNS PR Growth of the adult goldfish eye. III. Source of the new retinal cells. *J Comp Neurol* 1977; **176**:343-57.
181. WETTS R , FRASER SE Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science* 1988; **239**:1142-5.
182. WETTS R, SERBEDZIJA GN , FRASER SE Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. *Dev Biol* 1989; **136**:254-63.
183. PERRON M, KANEKAR S, VETTER ML et al. The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye. *Dev Biol* 1998; **199**:185-200.

184. TROPEPE V, COLES BL, CHIASSON BJ et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 2000; **287**:2032-6.
185. COLES BL , VAN DER KOOY D Isolation of retinal stem cells from the mouse eye. *J Vis Exp* 2010.
186. MAYER EJ, HUGHES EH, CARTER DA et al. Nestin positive cells in adult human retina and in epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol* 2003; **87**:1154-8.
187. HEVNER RF, HODGE RD, DAZA RA et al. Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. *Neurosci Res* 2006; **55**:223-33.
188. ROBERTSHAW E, MATSUMOTO K, LUMSDEN A et al. *Irx3* and *Pax6* establish differential competence for Shh-mediated induction of GABAergic and glutamatergic neurons of the thalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**:E3919-26.
189. CHAE JH, STEIN GH , LEE JE *NeuroD*: the predicted and the surprising. *Mol Cells* 2004; **18**:271-88.
190. CHO JH , TSAI MJ Preferential posterior cerebellum defect in *BETA2/NeuroD1* knockout mice is the result of differential expression of *BETA2/NeuroD1* along anterior-posterior axis. *Dev Biol* 2006; **290**:125-38.
191. MUÑOZ EM, BAILEY MJ, RATH MF et al. *NeuroD1*: developmental expression and regulated genes in the rodent pineal gland. *J Neurochem* 2007; **102**:887-99.
192. CASTRO AE, BENITEZ SG, FARIAS ALTAMIRANO LE et al. Expression and cellular localization of the transcription factor *NeuroD1* in the developing and adult rat pineal gland. *J Pineal Res* 2015; **58**:439-51.
193. OCHOCINSKA MJ, MUÑOZ EM, VELERI S et al. *NeuroD1* is required for survival of photoreceptors but not pinealocytes: Results from targeted gene deletion studies. *J Neurochem* 2012; **123**:44-59.
194. SZABO G, KATAROVA Z, KORTVELY E et al. Structure and the promoter region of the mouse gene encoding the 67-kD form of glutamic acid decarboxylase. *DNA Cell Biol* 1996; **15**:1081-91.
195. LONGO A, GUANGA GP , ROSE RB Crystal structure of E47-*NeuroD1*/beta2 bHLH domain-DNA complex: heterodimer selectivity and DNA recognition. *Biochemistry* 2008; **47**:218-29.
196. ROYBON L, MASTRACCI TL, RIBEIRO D et al. GABAergic differentiation induced by *Mash1* is compromised by the bHLH proteins *Neurogenin2*, *NeuroD1*, and *NeuroD2*. *Cereb Cortex* 2010; **20**:1234-44.
197. MAZURIER N, PARAIN K, PARLIER D et al. *Ascl1* as a novel player in the *Ptf1a* transcriptional network for GABAergic cell specification in the retina. *PLoS One* 2014; **9**:e92113.
198. MIYATA T, MAEDA T , LEE JE *NeuroD* is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev* 1999; **13**:1647-52.
199. BAYER SA, ALTMAN J, RUSSO RJ et al. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* 1993; **14**:83-144.
200. HATTEN ME , HEINTZ N Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu Rev Neurosci* 1995; **18**:385-408.
201. SGAIER SK, MILLET S, VILLANUEVA MP et al. Morphogenetic and cellular movements that shape the mouse cerebellum; insights from genetic fate mapping. *Neuron* 2005; **45**:27-40.
202. HATTEN ME , MASON CA Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia* 1990; **46**:907-16.

203. CHEDOTAL A Should I stay or should I go? Becoming a granule cell. *Trends Neurosci* 2010; **33**:163-72.
204. HOSHINO M, NAKAMURA S, MORI K et al. Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron* 2005; **47**:201-13.
205. GRIMALDI P, PARRAS C, GUILLEMOT F et al. Origins and control of the differentiation of inhibitory interneurons and glia in the cerebellum. *Dev Biol* 2009; **328**:422-33.
206. MUGNAINI E , FLORIS A The unipolar brush cell: a neglected neuron of the mammalian cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 1994; **339**:174-80.
207. ALVAREZ-VICENTE MI, LLORENS-MARTIN M, LACRUZ-PELEA C et al. [A new cerebellar neuron: the brush or monopolar cell. Characteristics and possible function]. *Rev Neurol* 2004; **38**:339-46.
208. DINO MR, SEKERKOVA G , MARTINA M Commentary on "E. Mugnaini and A. Floris, The Unipolar Brush Cell: A Neglected Neuron of the Mammalian Cerebellar Cortex. *J Comp Neurol*, 339:174-180, 1994". *Cerebellum* 2015.
209. KOFLER B, BULLEYMENT A, HUMPHRIES A et al. Id-1 expression defines a subset of vimentin/S-100beta-positive, GFAP-negative astrocytes in the adult rat pineal gland. *Histochem J* 2002; **34**:167-71.
210. HUMPHRIES A, KLEIN D, BALER R et al. cDNA array analysis of pineal gene expression reveals circadian rhythmicity of the dominant negative helix-loop-helix protein-encoding gene, Id-1. *J Neuroendocrinol* 2002; **14**:101-8.
211. MAN PS , CARTER DA Pineal gland expression of the transcription factor Egr-1 is restricted to a population of glia that are distinct from nestin-immunoreactive cells. *J Mol Histol* 2008; **39**:69-75.
212. LUO Y, LATHIA J, MUGHAL M et al. SDF1alpha/CXCR4 signaling, via ERKs and the transcription factor Egr1, induces expression of a 67-kDa form of glutamic acid decarboxylase in embryonic hippocampal neurons. *J Biol Chem* 2008; **283**:24789-800.
213. YANAGAWA Y, KOBAYASHI T, KAMEI T et al. Structure and alternative promoters of the mouse glutamic acid decarboxylase 67 gene. *Biochem J* 1997; **326** ( Pt 2):573-8.
214. PASSIATORE G, GENTILELLA A, ROM S et al. Induction of Id-1 by FGF-2 involves activity of EGR-1 and sensitizes neuroblastoma cells to cell death. *J Cell Physiol* 2011; **226**:1763-70.
215. GOLDMAN JM, MURR AS , COOPER RL The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2007; **80**:84-97.
216. SAVASTANO LE, CASTRO AE, FITT MR et al. A standardized surgical technique for rat superior cervical ganglionectomy. *J Neurosci Methods* 2010; **192**:22-33.
217. SEMINO-MORA C, DOI SQ, MARTY A et al. Intracellular and interstitial expression of *Helicobacter pylori* virulence genes in gastric precancerous intestinal metaplasia and adenocarcinoma. *J Infect Dis* 2003; **187**:1165-77.
218. WAGNER J, VITALI P, PALFREYMAN MG et al. Simultaneous determination of 3,4-dihydroxyphenylalanine, 5-hydroxytryptophan, dopamine, 4-hydroxy-3-methoxyphenylalanine, norepinephrine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, serotonin, and 5-hydroxyindoleacetic acid in rat cerebrospinal fluid and brain by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Neurochem* 1982; **38**:1241-54.

219. GREIF KF, ERLANDER MG, TILLAKARATNE NJ et al. Postnatal expression of glutamate decarboxylases in developing rat cerebellum. *Neurochem Res* 1991; **16**:235-42.
220. POPP A, URBACH A, WITTE OW et al. Adult and embryonic GAD transcripts are spatiotemporally regulated during postnatal development in the rat brain. *PLoS One* 2009; **4**:e4371.
221. KORPERSHOEK E, VERWEST AM, IJZENDOORN Y et al. Expression of GAD67 and novel GAD67 splice variants during human fetal pancreas development: GAD67 expression in the fetal pancreas. *Endocr Pathol* 2007; **18**:31-6.
222. CABEZAS C, IRINOPOULOU T, CAULI B et al. Molecular and functional characterization of GAD67-expressing, newborn granule cells in mouse dentate gyrus. *Front Neural Circuits* 2013; **7**:60.
223. WILLIAMSON S, FAULKNER-JONES BE, CRAM DS et al. Transcription and translation of two glutamate decarboxylase genes in the ileum of rat, mouse and guinea pig. *J Auton Nerv Syst* 1995; **55**:18-28.
224. BATTAGLIOLI G, LIU H, HAUER CR et al. Glutamate decarboxylase: loss of N-terminal segment does not affect homodimerization and determination of the oxidation state of cysteine residues. *Neurochem Res* 2005; **30**:989-1001.
225. BENITEZ SG, CASTRO AE, PATTERSON SI et al. Hypoxic preconditioning differentially affects GABAergic and glutamatergic neuronal cells in the injured cerebellum of the neonatal rat. *PLoS One* 2014; **9**:e102056.
226. FREDERIKSEN K, JAT PS, VALTZ N et al. Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron* 1988; **1**:439-48.
227. GARY KA, SANDS SA, CHRONWALL BM Glial-like cells of the rat pituitary intermediate lobe change morphology and shift from vimentin to GFAP expression during development. *Int J Dev Neurosci* 1995; **13**:555-65.
228. KIRIK OV, KORZHEVSKII DE Vimentin in ependymal and subventricular proliferative zone cells of rat telencephalon. *Bull Exp Biol Med* 2013; **154**:553-7.
229. SCHACHNER M, HUANG SK, ZIEGELMULLER P et al. Glial cells in the pineal gland of mice and rats. A combined immunofluorescence and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res* 1984; **237**:245-52.
230. WOHL SG, SCHMEER CW, FRIESE T et al. In situ dividing and phagocytosing retinal microglia express nestin, vimentin, and NG2 in vivo. *PLoS One* 2011; **6**:e22408.
231. PALMER TD Adult neurogenesis and the vascular Nietzsche. *Neuron* 2002; **34**:856-8.
232. LOUISSAINT A, JR., RAO S, LEVENTHAL C et al. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron* 2002; **34**:945-60.
233. HIRA Y, SAKAI Y, MATSUSHIMA S Quantitative light microscopic study on the heterogeneity in the superficial pineal gland of the rat. *Anat Rec* 1998; **250**:80-94.
234. TSAI MH, WEI IH, JIANG-SHIEH YF et al. Expression of protein gene product 9.5, tyrosine hydroxylase and serotonin in the pineal gland of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Neurosci Res* 2008; **60**:233-43.
235. ABD-EL-BASSET EM, FEDOROFF S Dynamics of actin filaments in microglia during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Acta Neuropathol* 1994; **88**:527-37.



236. ABD-EL-BASSET EM, PRASHANTH J , ANANTH LAKSHMI KV Up-regulation of cytoskeletal proteins in activated microglia. *Med Princ Pract* 2004; **13**:325-33.
237. MORIYAMA Y, YAMADA H, HAYASHI M et al. Intrinsic glutaminergic system negatively regulates melatonin synthesis in mammalian pineal gland. *Adv Exp Med Biol* 1999; **460**:83-90.
238. JUSUF PR, ALMEIDA AD, RANDLETT O et al. Origin and determination of inhibitory cell lineages in the vertebrate retina. *J Neurosci* 2011; **31**:2549-62.
239. HIRASAWA H, CONTINI M , RAVIOLA E Extrasynaptic release of GABA and dopamine by retinal dopaminergic neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015; **370**.
240. STEARDO L, MONTELEONE P, TRABACE L et al. Serotonergic modulation of rat pineal gland activity: in vivo evidence for a 5-Hydroxytryptamine(2C) receptor involvement. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **295**:266-73.
241. YAMADA H, HAYASHI M, UEHARA S et al. Norepinephrine triggers Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis of 5-hydroxytryptamine from rat pinealocytes in culture. *J Neurochem* 2002; **81**:533-40.
242. ROSENSTEIN RE, ; CARDINALI, D.P. Melatonin increases in vivo GABA accumulation in rat hypothalamus, cerebellum, cerebral cortex and pineal gland. *Brain Res* 1986; **398**:403-406.
243. GOMEZ ESTEBAN MB, MUÑOZ MOSQUEIRA MI, ARROYO AA et al. Postnatal neurogenesis in the cow pineal gland: an immunohistochemical study. *Histol Histopathol* 2013; **28**:385-403.
244. ALDER J, CHO NK , HATTEN ME Embryonic precursor cells from the rhombic lip are specified to a cerebellar granule neuron identity. *Neuron* 1996; **17**:389-99.
245. MACHOLD R , FISHELL G Math1 is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors. *Neuron* 2005; **48**:17-24.
246. KOMURO H, YACUBOVA E , RAKIC P Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci* 2001; **21**:527-40.
247. REDECKER P , VEH RW Glutamate immunoreactivity is enriched over pinealocytes of the gerbil pineal gland. *Cell Tissue Res* 1994; **278**:579-88.
248. GHIL SH, JEON YJ , SUH-KIM H Inhibition of BETA2/NeuroD by Id2. *Exp Mol Med* 2002; **34**:367-73.
249. LING F, KANG B , SUN XH Id proteins: small molecules, mighty regulators. *Curr Top Dev Biol* 2014; **110**:189-216.